
Charakterisierung des Glykoproteins des Virus der Bornaschen Krankheit

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Simone Kiermayer
aus Straubing

Marburg/Lahn 2002

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Januar 2000 bis Dezember 2002 im Institut für Virologie, Fachbereich Medizin, der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Professor Dr. Wolfgang Garten durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als
Dissertation am _____ angenommen.

Erstgutachter: Professor Dr. Wolfgang Buckel

Zweitgutachter: Professor Dr. Wolfgang Garten

Tag der mündlichen Prüfung:_____

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden zum Teil in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Kiermayer S., Kraus I., Richt J.A., Garten W. und Eickmann M. (2002). Identification of the amino terminal subunit of the glycoprotein of Borna disease virus. *FEBS Lett* 531: 255-8.

Die vorliegende Arbeit wurde durch ein Promotionsstipendium des Graduiertenkollegs 541 "Proteinfunktion auf atomarer Ebene" der Philipps-Universität Marburg gefördert.

Weitere Publikationen während der Dissertation:

Kraus I., Scheffczik H., Eickmann M., Kiermayer S., Stubbs M.T. und Garten W. (2002). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the matrix protein of Borna disease virus. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58: 1371-3.

Kraus I., Eickmann M., Kiermayer S., Scheffczik H., Fluess M., Richt J.A. und Garten W. (2001). Open reading frame III of borna disease virus encodes a nonglycosylated matrix protein. *J Virol* 75: 12098-104.

Scheffczik H., Kraus I., Kiermayer S., Bogner E., Holzenburg A., Garten W. und Eickmann M. (2001). Multimerization potential of the cytoplasmic domain of the human cytomegalovirus glycoprotein B. *FEBS Lett* 506: 113-6.

INHALTSVERZEICHNIS

<u>1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	1
<u>2 ZUSAMMENFASSUNG</u>	2
<u>3 EINLEITUNG</u>	3
3.1 Die Bornasche Krankheit.....	3
3.2 Die Pathogenese des Virus der Bornaschen Krankheit.....	3
3.3 Die Morphologie des Virus der Bornaschen Krankheit.....	4
3.4 Die Molekularbiologie des Virus der Bornaschen Krankheit.....	5
3.5 Das Glykoprotein des Virus der Bornaschen Krankheit.....	6
<u>4 ZIELSETZUNG</u>	8
<u>5 MATERIAL</u>	9
5.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	9
5.2 Antibiotika.....	9
5.3 Enzyme.....	10
5.4 Kits.....	10
5.5 Antikörper.....	10
5.6 Lektin-Sepharosekonjugate.....	11
5.7 Radioaktivität.....	12
5.8 Eukaryontische Zellen.....	12
5.9 Bakterien.....	13
5.10 Eukaryontische Expressionsvektoren.....	13
5.10.1 pCMUIV und dessen Derivate.....	13
5.10.2 pcDNA3.1	13

5.10.3 Chimäre Konstrukte aus CD8 α und BDV-	
Glykoproteindomänen.....	14
5.11 Oligonukleotide und Sequenzen.....	14
6 METHODEN	16
6.1 Molekularbiologische Methoden.....	16
6.1.1 Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien.....	16
6.1.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	16
6.1.3 RNA Isolierung aus eukaryontischen Zellen.....	16
6.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) und rekombinante PCR.....	16
6.1.5 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-	
PCR).....	17
6.1.6 Reinigung von PCR-Produkten.....	18
6.1.7 Verdau von doppelsträngiger DNA mit	
Restriktionsendonukleasen.....	18
6.1.8 Auftrennung von DNA in der Agarosegelelektrophorese.....	18
6.1.9 Elution von DNA aus Agarosegelen.....	19
6.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten.....	19
6.1.11 Kultivierung von Bakterien.....	19
6.1.12 Transformation von Bakterien mit DNA.....	20
6.1.13 DNA-Sequenzierung.....	21
6.2 Zellbiologische Methoden.....	22
6.2.1 Zellkulturtechnik.....	22
6.2.2 Einfrieren und Auftauen von eukaryontischen Zellen.....	22
6.2.3 Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryontischen Zellen.....	23

6.2.4 Biotinylierung von membranständigen Oberflächenproteinen eukaryontischer Zellen.....	24
6.2.5 Zellfraktionierung von eukaryontischen Zellen.....	24
6.2.6 Anreicherung von viralen Partikeln aus permanent BDV- infizierten Zellen.....	25
6.2.7 Infektion von eukaryontischen Zellen mit dem Virus der Bornaschen Krankheit.....	26
6.2.8 Metabolische Markierung von Proteinen eukaryontischer Zellen.....	26
6.3 Immunologische und Proteinchemische Methoden.....	26
6.3.1 Immunpräzipitation.....	26
6.3.2 Lektinpräzipitation.....	28
6.3.3 Endoglykosidase Behandlung.....	28
6.3.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	29
6.3.5 Elektrophoretische Übertragung von Proteinen auf Nitrozellulosemembran.....	30
6.3.6 Immunoblot.....	30
6.3.7 Der Chemoluminiszenz-Nachweis.....	31
6.3.8 Autoradiographie.....	31
6.3.9 Nachweis von Proteinen durch indirekte Immunfluoreszenz	32
7 ERGEBNISSE	34
7.1 Die Identifizierung des N-terminalen Spaltprodukts GP-N.....	34
7.1.1 Identifizierung des N-terminalen Spaltfragments in permanent BDV-infizierten Zellen.....	34

7.1.2 Nachweis des BDV-Glykoproteins in einer virusangereicherten Präparation.....	41
7.2 Der Intrazelluläre Transport des BDV-Glykoproteins.....	44
7.3 Funktionelle Untersuchung verschiedener Domänen des BDV- Glykoproteins im CD8-Reportersystem.....	47
7.3.1 Der mögliche Einfluss des Signalpeptids auf den intrazellulären Transport	48
7.3.2 Einfluss der Transmembrandomäne und zytoplasmatischen Domäne auf den intrazellulären Transport.....	50
8 DISKUSSION	56
8.1 Die Identifizierung des N-terminalen Spaltprodukts GP-N des BDV-Glykoproteins.....	56
8.2 Die Glykosylierung des BDV-GP und seiner Spaltprodukte GP-C und GP-N in permanent BDV-infizierten Zellen.....	58
8.3 Die subzelluläre Lokalisation des BDV-Glykoproteins und Identifizierung des Kompartiments der Spaltung.....	60
8.4 Der Einfluss unterschiedlicher Domänen des BDV-Glykoproteins auf den intrazellulären Transport – erste Untersuchungen im CD8-Reportersystem.....	62
8.5 Resümee.....	64
9 LITERATURVERZEICHNIS	66
10 ABBILDUNGS-UND TABELLENVERZEICHNIS	72
DANKSAGUNG	74
ERKLÄRUNG	75
LEBENS LAUF	76

1 Abkürzungsverzeichnis

BDV	Virus der Bornaschen Krankheit
CD8	Plasmamembranprotein zytotoxischer T- Zellen
ConA	Concanavalin A, Lektin aus <i>Canavalia ensiformis</i>
CT	zytoplasmatische Domäne
C-terminal/-Terminus	carboxyterminal/-Terminus
GNA	<i>Galanthus nivalis</i> Agglutinin, Lektin aus dem Schneeglöckchen
Endo H	Endoglykosidase H
ER	endoplasmatisches Retikulum
GA	Golgi Kompartiment
GP	ungespaltenes Glykoprotein Vorläufermolekül
GP-C	carboxyterminale GP Untereinheit
GP-N	aminoternale GP Untereinheit
mab	monoklonaler Antikörper
N-terminal/-Terminus	aminoternale/-Terminus
PNGase F	Peptid-N-glykosidase F
TM	Transmembrandomäne
WGA	Wheat Germ Agglutinin, Lektin aus Weizenkeimen

2 Zusammenfassung

Das Membranprotein des Virus der Bornaschen Krankheit wird als Polypeptid mit einer molekularen Masse von 57 kDa synthetisiert und posttranslational mit N-Glykanen modifiziert. Die proteolytische Prozessierung des Glykoproteinvorläufers GP (gp94, gp84) resultiert in einem membranständigen GP-C (gp43) und einem aminoterminalen, bislang hypothetischen GP-N (gp51). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals das stark glykosylierte GP-N in BDV-infizierten Zellen identifiziert werden. Dies wurde erreicht durch Lektinanreicherung und Erhöhung der Antigenität des GP-N mittels Deglykosylierung. Damit war es möglich die Zusammensetzung der viralen Hüllmembran genauer zu untersuchen. Sowohl GP-C als auch GP-N sind Bestandteil der viralen Hüllmembran. Das GP ist nicht detektierbar. Die Untersuchung der N-Glykane ergab, dass GP ausschließlich mannosereiche N-Glykane trägt, GP-C und GP-N jedoch teilweise komplex N-glykosyliert sind. Das deutet daraufhin, dass sie unterschiedlich intrazellulär transportiert werden. Die Zellfraktionierung von permanent BDV-infizierten Zellen zeigte erstmals, dass GP schon im endoplasmatischen Retikulum, oder einem diesem nahen intermediären Kompartiment, gespalten wird und hier stark akkumuliert. Diese Retention oder Retardierung von GP im endoplasmatischen Retikulum wurde mittels CD8-GP-Chimären im CD8-Reportersystem untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die carboxyterminalen Domänen des BDV-GP eine Akkumulation vermitteln, wobei für eine vollständige Inhibition des Transports an die Zelloberfläche die zytoplasmatische Domäne nicht hinreichend ist.

3 Einleitung

3.1 Die Bornasche Krankheit

Die Bornasche Krankheit wird in ihrer Symptomatik seit über 200 Jahren bei Pferden als sogenannte „Kopfkrankheit“ oder auch „Hirnwuth“ beschrieben. Ihren Namen erhielt sie nach epidemischem Auftreten unter Kavalleriepferden 1894/96 in der sächsischen Stadt Borna. Wilhelm Zwick beschrieb 1926 erstmals den Erreger der Bornaschen Krankheit als ultrafiltrierbares Agens und damit als ein Virus. In den siebziger Jahren gelang die Anzucht des Virus in Zellkultur (Mayr und Danner, 1972; Ludwig *et al.*, 1973; Herzog und Rott, 1980). Erst 1994 wurde sein Genom vollständig sequenziert (Briese *et al.*, 1994; Cubitt *et al.*, 1994). Das Virus der Bornaschen Krankheit (*engl.: borna disease virus*, BDV) besitzt einen sehr breiten Wirtstropismus (Heinig, 1969). Dieser reicht von den häufig beschriebenen Fällen von natürlichen Infektionen bei Pferden, Schafen, Rindern, neuerdings auch dokumentiert für Katzen, Hunde u.v.a., bis hin zur experimentellen Infizierbarkeit einer Vielzahl verschiedener Kleinsäuger, Vögel und Primaten (Dürrwald und Ludwig, 1997; Schwemmler, 1999). Ob auch der Mensch als ein Wirt für das Virus in Frage kommt und verschiedene humane neuro-psychiatrische Erkrankungen mit einer Infektion des Virus der Bornaschen Krankheit verbunden sind, wird seit vielen Jahren kontrovers diskutiert. Diese Frage ist bis heute noch nicht zufriedenstellend beantwortet worden (de la Torre, 2000a). In ihrem klinischen Verlauf gehört die Bornasche Krankheit zu den "slow-virus-diseases", das Virus kann sehr große Zeiträume, von einigen Wochen bis hin zu Jahren, im infizierten Tier persistieren, ohne dass sich die Erkrankung klinisch manifestieren muss (Vahlenkamp *et al.*, 2002; Ludwig *et al.*, 1985 und 1973).

3.2 Die Pathogenese des Virus der Bornaschen Krankheit

Das Virus verhält sich strikt neurotrop und gelangt über die Nasen- oder Rachenschleimhäute in die offenen Nervenendigungen des *Nervus*

olfactorius und des *Nervus trigeminus*. Es wird streng intraaxonal zum Gehirn transportiert. Im Zentralen Nervensystem findet nur eine geringe Virusfreisetzung statt. Die Pathogenese ist auf eine T-Zell-vermittelte immunpathologische Reaktion zurückzuführen (Richt *et al.*, 1991; Stitz *et al.*, 1993; Richt *et al.*, 1994). BDV-spezifische CD8-positive T-Zellen zerstören die BDV-infizierten Gehirnzellen. In Folge dessen entwickelt sich eine nicht-eitrige Meningoenzephalomyelitis. Histologisch sind Infiltrationen mononukleärer Zellen (Lymphozyten und Plasmazellen) in perivaskulären und parenchymalen Bereichen des Gehirns sichtbar. Besonders betroffen ist das Limbische System mit der grauen Substanz des basalen Cortex, des Hippocampus, des *Nucleus caudatus* und des *Bulbus olfactorius* (Gosztanyi und Ludwig, 1984).

3.3 Die Morphologie des Virus der Bornaschen Krankheit

Die viralen Partikel besitzen eine Lipidmembran und haben einen Durchmesser von 80-100 nm (Elford *et al.*, 1933; Danner und Mayr, 1979). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass etwa 7 nm lange Spikes inseriert sind (Kohno *et al.*, 1999). Im Innern befindet sich der Ribonukleoproteinkomplex mit einem Durchmesser von etwa 4 nm. In diesen Untersuchungen sind erste immunelektronenmikroskopische Bilder gelungen, die zeigten, wie sich Areale der Zellmembran mit Spikestrukturen anreicherten und sphärisch in den extrazellulären Raum ausdehnten. Unterhalb dieser oberflächlichen Bereiche bilden sich granuläre Strukturen mit hoher Elektronendichte. Anschließend wird ein extrazelluläres Partikel abgeschnürt. Diese Befunde sprechen für die Freisetzung von viralen Partikeln durch einen Knospungsprozess an der Zelloberfläche.

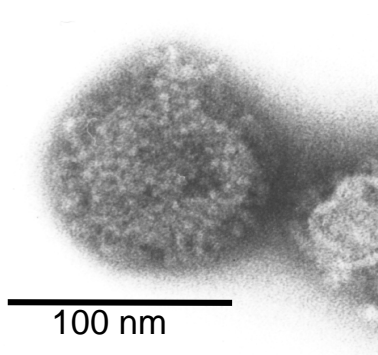


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines freien, pleomorphen Partikels des Virus der Bornaschen Krankheit. Der schwarze Balken entspricht 100 nm im Maßstab 1: 380000 [Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Eickmann, Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg].

3.4 Die Molekularbiologie des Virus der Bornaschen Krankheit

Das Virus der Bornaschen Krankheit besitzt ein einzelsträngiges, kontinuierliches RNA-Genom in negativer Orientierung (de la Torre *et al.*, 1990). Aufgrund besonderer Merkmale wurde den verschiedenen BDV-Stämmen eine eigenständige Familie, die *Bornaviridae*, innerhalb der Ordnung der *Mononegavirales* (*Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Filoviridae*) zugewiesen. Das Genom ist vergleichsweise klein (Rhabdoviren: 12 kb; Filoviren: etwa 19 kb, Paramyxoviren: 18 kb). Es umfasst 8900 Ribonukleotide (de la Torre *et al.*, 1990), flankiert von einer 3'-*leader* und einer 5'-*trailer* Region, die nicht transkribiert werden. BDV repliziert und transkribiert sein Genom im Kern der infizierten Zellen (de la Torre, 1990; Briese *et al.*, 1992; Cubitt und de la Torre, 1994). Diese Eigenschaft findet sich innerhalb der *Mononegavirales* nur noch bei pflanzenpathogenen Vertretern der *Rhabdoviridae* (Heaton *et al.*, 1987). Bisher konnten sechs offene Leserahmen identifiziert werden, die zum Teil überlappen (de la Torre *et al.*, 2002). Die entsprechenden Genprodukte wurden durch Untersuchungen in infizierten Geweben und in der Zellkultur bestätigt. In der Reihenfolge vom 3'-Ende zum 5'-Ende kodiert es für die Proteine (Abbildung 2): p40 (Nukleoprotein), p10 (X-Protein), p24 (Phosphoprotein), p16 (Matrixprotein; Kraus *et al.*, 2001), p57 (Glykoprotein) und p180/190 (RNA-abhängige RNA Polymerase). Es enthält drei Transkriptionsstartstellen und vier Terminationsstellen (Schneemann *et al.*, 1994). Außer dem Nukleoprotein werden alle anderen Proteine nach Spleißprozessen von polycistronischen Primärtranskripten translatiert. Die Transkripte sind am 5'-Ende mit einer sogenannten *Cap*-Struktur ausgestattet und besitzen am 3'-Ende eine Polyadenylsequenz (Briese *et al.*, 1994; Cubitt *et al.*, 1994).

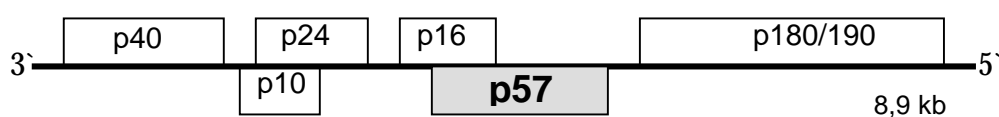


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des BDV-Einzelstrang-RNA-Genoms in negativer Orientierung. Die sechs offenen Leserahmen und die kodierten Genprodukte: p40, Nukleoprotein; p24, Phosphoprotein; p10, X-Protein; p16, Matrixprotein; p57, Glykoproteinvorläufer (grau hinterlegt); p180/190, RNA-abhängige RNA-Polymerase.

3.5 Das Glykoprotein des Virus der Bornaschen Krankheit

Das BDV-Glykoprotein ist in der viralen Hüllmembran inseriert. Es wird als sogenanntes p57 mit einer molekularen Masse von 56,5 kDa (503 Aminosäuren) im vierten offenen Leserahmen kodiert. Die Translation des p57 entsteht durch *leaky ribosomal scanning* des polycistronischen Primärtranskripts, das für p16 und p57 kodiert und zwei Introns enthält. Das erste Translationsstartkodon des p16 wird überlesen und das um ein Nukleotid verschobene AUG des p57 genutzt. Die Translationseffizienz des zweiten Leserahmens kann durch das Spleißen des ersten Introns im Bereich des p16 erhöht werden, wobei für das p16 nur eine minicistronische Region zurück bleibt (Schneider *et al.*, 1997b). Das glykosylierte GP wurde als gp94, als gp84 oder als G-Protein beschrieben (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1997; Richt *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 1997a).

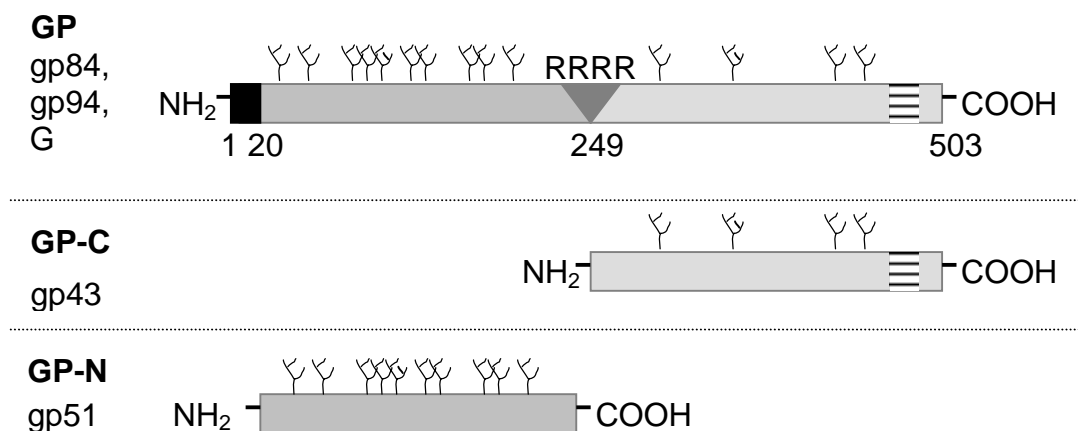


Abbildung 3: Schematischer Überblick zum BDV-Glykoprotein und seinen Spaltprodukten. Das Vorläufermolekül GP mit 94 kDa (auch als G, gp94 oder gp84 bezeichnet). Das C-terminale Spaltprodukt GP-C mit 43 kDa (gp43) und das N-terminale Spaltfragment mit einer errechneten molekularen Masse von 51 kDa (gp51). Schwarz gefüllte Fläche stellt das N-terminale Signalpeptid dar, schwarz-weiß gestreifte Flächen symbolisieren die Transmembrandomäne zur Membranverankerung, Bäumchen zeigen die Verteilung der potentiellen N-Glykosylierungsstellen. Dunkelgraues Dreieck stellt die Spaltstelle mit basischem Tetrapeptid (R=Arginin) dar. Die Ziffern entsprechen den Aminosäurepositionen im Protein.

Es wird kotranslational, vermittelt durch ein N-terminales Signalpeptid, in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums synthetisiert und posttranslational N-glykosyliert. Es sind 14 Sequenzmotive Asn-X-Ser/Thr innerhalb der Aminosäuresequenz des p57 vorhanden. Diese potentiellen N-Glykosylierungsstellen werden sehr wahrscheinlich alle genutzt, da das Glykoprotein nach dieser Modifikation eine deutlich erhöhte molekulare Masse von 94 kDa erreicht. Weitere Modifikationen sind nicht bekannt. Das GP muss für seine biologische Funktion, bzw. seine fusionsvermittelnde Eigenschaft, gespalten vorliegen. Am tetrabasischen Aminosäuremotiv (RRRR) an Aminosäureposition 249 wird das Glykoprotein proteolytisch aktiviert (Richt *et al.*, 1998). Dieser Vorgang ist essentiell für die Infektiosität des Virus. Sie resultiert in einem nachweisbaren C-terminalen, membranständigen Spaltfragment GP-C (43 kDa) und einem N-terminalen Spaltprodukt GP-N (51 kDa), das bisher nicht detektiert wurde (Abbildung 3). An der Zelloberfläche, wo die Virusmorphogenese stattfindet, konnte sowohl das ungespaltene GP als auch das GP-C gezeigt werden. Im Viruspartikel ist nur das C-terminale Spaltprodukt nachweisbar (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1998). Der Mechanismus dieses selektiven Einbaus ist nicht geklärt. Ebenso sind der intrazelluläre Reifungsweg sowie das zelluläre Kompartiment der Spaltung noch nicht bekannt. Für das C-terminale Spaltprodukt wird eine Beteiligung bei der pH-abhängigen Membranfusion nach der Internalisierung des BDV durch Endozytose vorgeschlagen (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1998). Das hypothetische N-terminale Spaltprodukt mit einem errechneten Molekulargewicht von 51 kDa konnte bislang nur durch eine in vitro durchgeführte Spaltung mit löslichem Furin generiert werden (Lenz, 1998). In einer neueren Untersuchung an Pseudotypen des Vesikular Stomatitis Virus (VSV) mit inserierten Glykoprotein Chimären des GP-N mit dem VSV-Glykoprotein, wird dem N-terminalen Anteil eine Funktion bei der Rezeptorbindung zugeschrieben (Perez *et al.*, 2001). Damit sind Antikörper gegen N-terminal gelegene Epitope hinreichend, um infektiöses Virus zu neutralisieren.

4 Zielsetzung

Das Glykoprotein ist das einzige integrale Membranprotein der Virus der Bornaschen Krankheit (BDV) und für die Infektiosität des Virus, das heißt für den initialen Zellkontakt und die Aufnahme des Nukleokapsids, von großer Bedeutung. Voraussetzung dafür ist die proteolytische Aktivierung des Glykoprotein Vorläufermoleküls GP. Die Spaltung resultiert in einem membranständigen, bereits identifizierten Spaltfragment GP-C. Der Verbleib und die Funktion des bisher hypothetischen N-terminalen Spaltprodukts GP-N sollte in dieser Arbeit aufgeklärt werden. So stellte sich die Frage, ob GP-N in BDV-infizierten Zellen als stabiles Spaltprodukt existiert und ob es ein Bestandteil des Virus ist. Damit verbunden ist der intrazellulären Transport des Glykoproteins an die Zelloberfläche, den Ort der Virusmorphogenese. Das GP ist nur unvollständig gespalten und in geringen Quantitäten an der Zelloberfläche nachgewiesen worden. Gemeinsam mit der Beobachtung das GP ausschließlich mannosereich N-glykosyliert ist, und damit als „unreifes“ Glykoprotein an die Zelloberfläche gelangt, stellte sich für die vorliegende Arbeit die Frage nach dem intrazellulären Weg des GP und dem zellulären Kompartiment der Spaltung. Die Art der N-Glykosylierung der Spaltprodukte war dabei besonders interessant, weil sie eng mit dem intrazellulären Transportweg verbunden ist.

5 Material

5.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Nicht näher bezeichnete Standardchemikalien stammen von den Firmen Biorad (München), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) oder Riedel-de-Haen (Seelze).

Acrylamidlösung Gel 30	Roth, Karlsruhe
Aprotinin (Trasylo [®])	Bayer, Leverkusen
BSA (Rinderserumalbumin)	Serva, Heidelberg
Cholera Toxin, B-Untereinheit mit Biotin gekoppelt	Sigma, Deisenhofen
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
DABCO (1,4-diazabicyclo-[2.2.2]octan)	Sigma, Deisenhofen
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochlorid)	Molecular Probes, Leiden, NL
Dulbecco's MEM (à la Brandl)	Gibco BRL, Eggenstein
FKS (fötales Kälberserum)	Gibco BRL, Eggenstein
Gewebekulturflaschen/-schalen	Costar, Cambridge, MA, USA
Kanüle 25G	Becton Dickinson, Heidelberg
Lipofektin	Gibco BRL, Eggenstein
Mass Ruler [™] DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Opti-MEM	Gibco BRL, Eggenstein
Optiprep (Iodixanol)	Sigma, Deisenhofen
Rainbowmarker (RPN 800, 756)	Amersham, Braunschweig
Spritze 1 mL	Becton Dickinson, Heidelberg
Streptavidin-Peroxidase Komplex	Amersham, Braunschweig
Streptavidin-Fluoreszein Komplex	Amersham, Braunschweig
Sulfo-NHS-Biotin	Pierce, Rockford, USA
Zellschaber	Costar, Cambridge, MA, USA

5.2 Antibiotika

Ampicillin (Amblosin [®])	Bayer, Leverkusen
Penicillin/Streptomycin (100x)	Gibco BRL, Eggenstein

5.3 Enzyme

Restriktionsenzyme/-puffer	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Endoglykosidase H (Endo H)	Roche, Mannheim
Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F)	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Trypsin/EDTA	Life Technologies, Karlsruhe

5.4 Kits

ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
Expand™ High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate	Pierce, Rockford, USA

5.5 Antikörper

Erstantikörper:

Rb-αGP-C	<p>Polyklonaler Serum-Antikörper vom Kaninchen, spezifisch für das Peptid</p> <p>NH₂-ASASQFLRSWLNHPD-COOH</p> <p>aus der luminalen Domäne der C-terminalen Untereinheit des GP (p57) des Virus der Bornaschen Krankheit (Richt <i>et al.</i>, 1998).</p>
Rb-αGP-N	<p>Polyklonaler Serum-Antikörper vom Kaninchen, spezifisch für das Peptid</p> <p>NH₂-CKTYWGFFGSYSADRIINRYTGTVKGC-COOH</p> <p>aus der N-terminalen Untereinheit des GP (p57) des Virus der Bornaschen Krankheit (Kiermayer <i>et al.</i>, 2002).</p>

Okt8	monoklonaler CD8 spezifischer Antikörper von der Maus (freundlicherweise erhalten von Prof. Dr. K. Radsak, Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg; Hoffmann <i>et al.</i> , 1982)
Bo18	monoklonaler Antikörper gegen das Nukleoprotein des Virus der Bornaschen Krankheit (freundlicherweise erhalten von Dr. J. A. Richt, Justus-Liebig-Universität Giessen).
Anti-BiP	monoklonaler BiP-spezifischer Antikörper von der Maus (Transduction Laboratories, Lexington, USA).
Anti-GM130	monoklonaler GM130-spezifischer Antikörper von der Maus (Transduction Laboratories, Lexington, USA).

Zweitantikörper:

Anti-Maus-IgG vom Kaninchen	DAKO, Hamburg
Peroxidase-konjugiertes Anti-Maus-IgG vom Kaninchen	DAKO, Hamburg
Peroxidase-konjugiertes Anti-Kaninchen-IgG vom Schwein	DAKO, Hamburg
Alexa Fluor [®] 594 (rot) konjugiertes Anti-Maus-IgG von der Ziege	Molecular Probes, Leiden, NL
Alexa Fluor [®] 488 (grün) konjugiertes Anti-Maus-IgG von der Ziege	Molecular Probes, Leiden, NL

5.6 Lektin-Sepharosekonjugate

Concanavalin A (ConA)	Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach
<i>Galanthus nivalis</i> Agglutinin (GNA)	Alexis Biochemicals, Grünberg
<i>Helix pomatia</i> (HP)	Sigma, Deisenhofen
<i>Jacalin</i> (Jac)	Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach
<i>Phytolacca americana</i> (PA)	Sigma, Deisenhofen
Soybean (Soy)	Sigma, Deisenhofen
Wheat Germ Agglutinin (WGA)	Alexis Biochemicals, Grünberg
<i>Ulex europeaus</i> UEA1	Sigma, Deisenhofen

Für die metabolische [^{35}S]-Zellmarkierung, bezogen von der Fa. Amersham Buchler (Braunschweig).

5.9 Bakterien

E.coli, Stamm XL-1 blue [K12, recA 1, lac, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, (F'proAB, lacIq, lacZ dM15 Tn10)] Fa. Stratagene, Heidelberg.

5.10 Eukaryontische Expressionsvektoren

5.10.1 pCMUIV und dessen Derivate

Die eukaryontischen Expressionsvektoren pCMUIV, pCMUIV-CD8 und pCMUIV-CD8/E19 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. K. Radsak zur Verfügung gestellt und stammten von Dr. T. Nilsson aus Heidelberg. Durch das β -Laktamase-Gen (Ampicillinresistenzgen) können diese Shuttle-Vektoren selektiv in Bakterien amplifiziert („low-copy“ Plasmide) und nach Transfektion in eukaryontischen Zellen zur Expression eines Fremdgens verwendet werden. Das Fremdgen wird unter der Kontrolle eines α -Globin Promotors und eines SV40-Enhancer exprimiert. Der Vektor pCMUIV-CD8 ist ein Derivat des pCMUIV. Die Sequenz der CD8 α -Untereinheit wurde hinter die Promotor/Enhancer Region über zwei BamHI-Restriktionsschnittstellen inseriert. Der Vektor pCMUIV-CD8-E3/K19 leitet sich vom pCMUIV-CD8 ab. Es wurde über eine BamHI-Restriktionsschnittstelle der zytoplasmatische Anteil des CD8 α durch das zytoplasmatische Signal des adenoviralen E3/K19 Chaperons für eine Retention im endoplasmatischen Retikulum inseriert (Nilsson *et al.*, 1989).

5.10.2 pcDNA3.1

Vektor zur eukaryontischen Expression eines Fremdgens unter der Kontrolle des Promotors des Zytomegalievirus. Selektive Amplifikation in Bakterien mit der β -Laktamase-kodierten Ampicillinresistenz und Möglichkeit zur Herstellung stabiler eukaryontischer Zellklone mittels einer pcDNA 3.1 kodierten Neomycinresistenz. Der Vektor stammt von der Fa. Invitrogen (Karlsruhe).

5.10.3 Chimäre Konstrukte aus CD8 α und BDV-Glykoproteindomänen

Die chimären Fusionsproteine CD8-BDV-CT und CD8-BDV-TM/CT wurden durch Subklonierung zweier BDV-Glykoproteindomänen hergestellt: Die zytoplasmatische Domäne (Aminosäureposition 486 bis 503) wurde über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und BamHI in den Vektor pCMUIV-CD8 kloniert. Die Transmembrandomäne wurde mit der zytoplasmatischen Domäne (Aminosäureposition 463 bis 503) über die Restriktionsschnittstellen XbaI und BamHI in den pCMUIV-CD8 ligiert (6.1.7). Die BDV-Glykoproteinfragmente wurden via RT-PCR (6.1.5) aus genomischer BDV-RNA (NCBI, Accession Nr.: NC_001607 GI: 9627497) generiert. Um DNA-Fragmente mit ausreichender Nukleotidzahl amplifizieren zu können, wurde ein Anteil nicht p57-kodierende BDV-genomische Sequenz mitkloniert (bis Genomposition 4010). Das chimäre Konstrukt BDV-SP-CD8 mit dem Signalpeptid des BDV-Glykoproteins wurde mittels rekombinanter PCR (6.1.4) aus einem mit PCR amplifizierten CD8-Fragment ohne Signalpeptid und einem doppelsträngigen Oligonukleotid, das der Sequenz des BDV-Signalpeptids entsprach, hergestellt und über die Restriktionsschnittstellen HindIII und XhoI in den Vektor pcDNA3.1 (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert.

5.11 Oligonukleotide und Sequenzen

Die Bindungsorte der verwendeten Oligonukleotide (Sigma-Genosys Ltd., Cambridge, UK) in den Aminosäuresequenzen von CD8 α bzw. BDV-p57 zur Herstellung der CD8-Chimären BDV-SP-CD8, CD8-BDV-TM/CT und CD8-BDV-CT sind schematisch dargestellt (Abbildung 4). Den Klonierungen und dem Oligonukleotiddesign lagen die Sequenz des humanen CD8 α nach Littman *et al.* (1985; NCBI, Accession Nr.: NM_001768 GI:22902133) und des BDV-Glykoproteins nach Briese *et al.* (1994; NCBI, Accession Nr.: NC_001607 GI: 9627497) zugrunde.

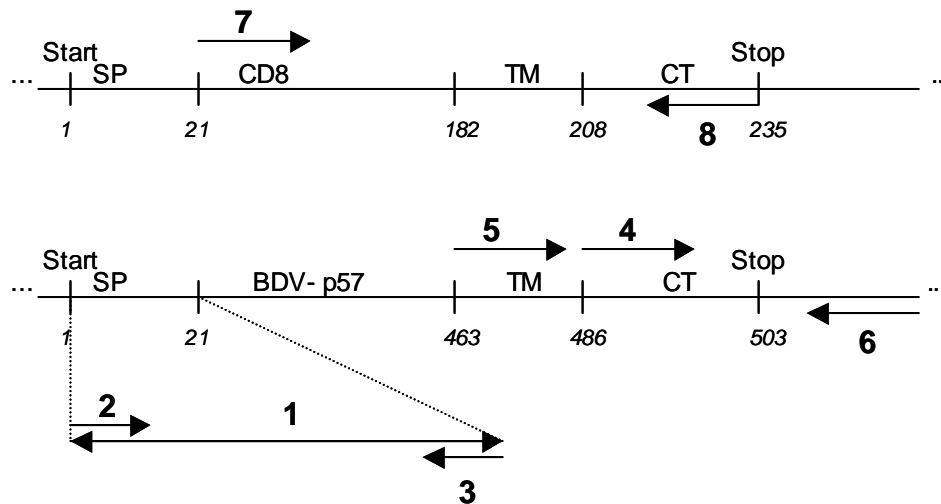


Abbildung 4: Schematische Übersicht der Bindungsorte der verwendeten Oligonukleotide. Pfeil mit Ziffer (fett), Oligonukleotid; SP, Signalpeptid; TM, Transmembrandomäne; CT, zytoplasmatische Domäne; kursive Ziffern geben die Aminosäureposition im Protein an.

Die unter Abbildung 4 eingezeichneten Oligonukleotide sind in der folgenden Übersicht mit Namen und Nukleotidsequenz zusammengefasst.

Name	Sequenz 5'→3'
1) BDV-SP2-Clal-CD8	GC AAG CTT ATG CAG CCT TCA ATG TCT TTT CTT ACC GGC TTC GGA ACA TTG GTG TTG GCC CTC TCG GCC CAG ACA ATC GAT GGC CCG AGC CAG TTC CGG GTG TCG CCG CTG
2) SP-f	GC AAG CTT ATG CAG CCT TCA ATG TCT
3) SP-r	CAG CGG CGA CAC CCG GAA CTG GCT
4) BDV-CT-486f	GCT CTA GAG TTT CCT TGC CAG CCT C
5) BDV-TM-CT-463f	CGG ATA TCG GGT GGT TGA GGG AC
6) BDV-rna-4010r	GCG GAT CCT AAC TGT TAG TAT GGC CTC
7) CD8-AS21f	ATC GAT CCG AGC CAG TTC CGG
8) CD8-r	GG CTC GAG TTA GAC GTA TCT CGC

6 Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben, entsprechen die in der Arbeit angewendeten molekularbiologischen Methoden den Standardverfahren nach Sambrook *et al.* (1989).

6.1.1 Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien

Für die Isolierung von bis zu 20 µg Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet und zur Isolierung von großen Mengen Plasmid-DNA wurde das „HiSpeed Plasmid Maxi Kit“ nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

6.1.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA in wässriger Lösung wurde in einer Quarzküvette gegen den Blindwert von *aqua dest.* photometrisch (Gene Quant II RNA/DNA Calculator, Pharmacia) bestimmt. Einer ΔE_{260nm} von 1 entsprechen näherungsweise Konzentrationen von 50 µg/mL für einzelsträngige DNA und 20 µg/mL für Oligonukleotide.

6.1.3 RNA Isolierung aus eukaryontischen Zellen

Zur Amplifikation von viralen Genfragmenten via RT-PCR wurde RNA aus permanent BDV infizierten C6 Zellen mit dem „Rneasy Mini Kit“ der Firma Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers präpariert und bei –80°C für bis zu vier Wochen gelagert.

6.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) und rekombinante PCR

Die PCR wurde zur Produktion von Fragmenten für Subklonierungen verwendet. Die Reaktion wurde in 200 µL Reaktionsgefäßen in einem „GeneAmp PCR System 2700“ (Applied Biosystems) unter Verwendung des „Taq PCR Core Kits“ der Fa. Qiagen durchgeführt. Die doppelsträngige DNA Matrize wird 5 min bei 95°C denaturiert, dann folgt 25-35 mal der Reaktionszyklus: Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden, Hybridisierung der Oligonukleotide für 30 bis 60 Sekunden und die

Amplifikation der entsprechenden DNA-Abschnitte bei 68-72°C für näherungsweise 1 min pro 1000 Nukleotide. Die Hybridisierungstemperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur der Oligonukleotide, die sich nach der Formel $T_m(^{\circ}\text{C}) = 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A} + \text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{G} + \text{C})$ berechnet. Dabei werden nur bindende Nukleotide berücksichtigt. Eine abschließende Inkubation bei der jeweiligen Amplifikationstemperatur für sieben Minuten dient der Vervollständigung der Amplifikate. Die Reaktionsansätze mit einem Gesamtvolumen von 50 µL enthalten folgende Komponenten: 100 ng dsDNA, 30 pmol je Oligonukleotid (vorwärts und rückwärts), 400 µM dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 mM MgCl₂, 1 Einheit DNA-Polymerase und 1 x Reaktionspuffer (Zusammensetzung nach Angaben des Herstellers). Um Sekundärstrukturen zu vermeiden, wurden jeweils 5 µL „Q-Solution“ (Qiagen, Hilden) zugesetzt.

Rekombinante PCR: Diese Methode wurde verwendet, um eine CD8-BDV-Glykoprotein Chimäre herzustellen. CD8α ohne Signalpeptid und das BDV-Glykoprotein Signalpeptid wurden mittels PCR generiert und mit den einander entsprechenden Sequenzüberhängen versehen. Um die beiden DNA-Fragmente zu einem Fusionsfragment zu amplifizieren, wurde jeweils 1 µg der zu fusionierenden doppelsträngigen DNA verwendet und zur Amplifikation des daraus resultierenden rekombinanten DNA-Fragments wurden die an den 5'-Enden bindenden Oligonukleotide (vorwärts und rückwärts orientiert) der Reaktion zugesetzt. Weitere Komponenten und Reaktionsparameter entsprachen denen einer PCR.

6.1.5 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Um DNA-Abschnitte aus dem RNA-Genom des Virus der Bornaschen Krankheit zu amplifizieren, wurde das „One Step RT-PCR Kit“ der Firma Qiagen verwendet. Als Matrize dienten 5 µL einer Präparation von Gesamt-RNA aus BDV-infizierten Zellen (10⁵ Zellen). Der Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µL setzte sich nach Angaben des Herstellers unter Verwendung von je 30 pmol Oligonukleotiden und 5 µL „Q-Solution“ zusammen. Der eigentlichen PCR (siehe 6.1.4) geht eine

reverse Transkription von RNA in cDNA voraus, dabei wird der Reaktionsansatz für 30 min bei 50°C inkubiert.

6.1.6 Reinigung von PCR-Produkten

PCR-DNA-Fragmente wurden mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers von Verunreinigungen wie Primern, Nukleotiden und Proteinen befreit, um nachfolgende enzymatische Reaktionen nicht zu beeinträchtigen.

6.1.7 Verdau von doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für einen analytischen Verdau wurden 0,2-1 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Präparativer Verdau zur Subklonierung wurde mit 5-20 µg DNA durchgeführt. Die verwendeten Endonukleasen (30 Einheiten/Reaktion) und Pufferlösungen stammten von MBI Fermentas und wurden nach Angaben des Herstellers verwendet.

6.1.8 Auftrennung von DNA in der Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von geschnittener Plasmid-DNA (6.1.7) zur Analyse oder zur Gewinnung definierter Fragmente erfolgte in 0,8-1,5 %igen Agarosegelen (w/v) in 0,5 x TBE Puffer. Für die Elektrophorese wurde eine horizontale Gelkammer verwendet und eine Spannung von 8 V/cm Gellänge angelegt. Proben wurden vor dem Auftragen mit 6 x Probenpuffer versetzt (6 x Mass Loading Dye Solution, MBI Fermentas) und zur Abschätzung der Fragmentgrößen der Mass Ruler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermentas) mit aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Agarosegele in Ethidiumbromidlösung (0,006%, w/v) 20 min gefärbt und photographisch dokumentiert.

10x TBE-Puffer

Tris	1 M
Borsäure	830 mM
EDTA	12,7 mM
<i>in aqua dest.</i>	

6.1.9 Elution von DNA aus Agarosegelen

Definierte DNA-Fragmente nach präparativem Verdau (6.1.7) und Auftrennung in der Agarosegelelektrophorese (6.1.8) wurden mit dem „QIAquick Gel Extraktion Kit“ der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers aus der Agarose eluiert.

6.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation zwischen DNA Fragmenten erfolgte mittels 5 Einheiten T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas), welche unter ATP-Verbrauch 3'-OH-Gruppen mit 5'-Phosphatresten verbindet. Linearisierte Plasmid-DNA (6.1.7) wurde in einem molaren Verhältnis von 1:5 zur Insert-DNA (6.1.9) in einem Gesamtreaktionsvolumen von 20 µL eingesetzt. Der ATP-haltige Reaktionspuffer stammt von MBI Fermentas.

6.1.11 Kultivierung von Bakterien

Alle benötigten Kulturen von *E. coli* wurden in Luria-Bertani Medium bzw. auf Luria-Bertani Agar bei 37 °C angezogen. Zur Selektion von plasmidtragenden Klonen wurde den Medien 0,1 mg/mL Ampicillin zugesetzt.

Luria-Bertani (LB) Medium

Bacto-Hefe-Extrakt	5 g/L
Bacto-Trypton	10 g/L
Natriumchlorid	10 g/L
<i>ad. aqua dest.</i>	

Luria-Bertani Agar

Bacto-Agar	15 g/L
Luria-Bertani Medium	1 L

Zur Herstellung einer Übernachtskultur wurden 5 mL LB-Medium mit einer steril gepickten Kolonie von einer LB-Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler (200 UpM) inkubiert. Zur Lagerung von Bakterienstämmen wurden Übernachtskulturen mit 15% Glycerin versetzt und bei -20 °C eingefroren.

6.1.12 Transformation von Bakterien mit DNA

Für die Transformation von Bakterien wurden 100 mL LB-Medium (6.1.11) mit 100 µL einer Übernachtskultur (1:100) angeimpft und bei 37 °C auf einem Schüttler (200 UpM) inkubiert. Das Wachstum der Kultur wurde durch photometrische Messung der O.D. bei einer Wellenlänge von 600 nm kontrolliert. Als Blindwert diente hierbei die O.D.₆₀₀-Messung von LB-Medium. Als eine O.D.₆₀₀ von 0,5-0,6 erreicht war, wurde die Bakterienkultur 20 min auf Eis abgekühlt, bei 1275 UpM/4 °C für 10 min pelletiert (Minifuge T, Heraeus, Hanau) und in 10 mL eiskaltem TSS-Puffer resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 10 min auf Eis. 200 µL der kompetenten Bakteriensuspension und 10 µL Plasmidlösung (0,001-0,5 pmol) wurden in einem Eppendorfgefäß gemischt und für 45 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA in die kompetenten Bakterien erfolgt bei einer anschließenden Inkubation bei 42 °C für 90 Sekunden. Nach Abkühlung auf Eis (2 min) wurden dem Transformationsansatz 800 µL LB-Medium zugesetzt. Durch Inkubation für weitere 60 min bei 37 °C konnte sich die plasmidkodierte Antibiotikaresistenz (β-Laktamase-Expression, Ampicillinresistenz) ausbilden. Es wurden jeweils 100 µL und das Restvolumen, nach Zentrifugation (1 min ,13000 UpM, Microfuge 22 R, Hettich, Tuttlingen) und Resuspension in 100 µL LB-Medium, auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/mL) ausplattiert. Unter diesen Selektionsbedingungen wuchsen während einer Inkubation von 16 Stunden bei 37 °C nur die transformierten Bakterienklone. Als Kontrolle dienten kompetente Zellen ohne Plasmid. Die Platten mit gewachsenen Bakterienkolonien wurden mit Parafilm versiegelt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

TSS-Puffer (Transformation and Storage Solution)

LB-Medium	85% (v/v)
Polyethylenglykol 8000	10% (w/v)
DMSO	5% (v/v)
MgCl ₂	50 mM

in aqua dest. und steril filtriert

6.1.13 DNA-Sequenzierung

Für die Vorbereitung der Sequenzierproben wurde das „ABI PRISM™ Dye Terminator Sequencing Ready Reaction Kit“ (Fa. Perkin Elmer) verwendet, für die Sequenzierung selbst wurde der ABI PRISM 377 DNA Sequencer der Fa. Perkin Elmer eingesetzt. Bei der Methode des Cycle-Sequencing handelt es sich um eine enzymatische in vitro Synthese von Einzelstrang-DNA, wobei es durch die vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten 2',3'-Dideoxynucleotiden (bzw. *dye-terminatoren*), die neben der normalen dNTP-Ausstattung im Terminationsmix enthalten sind, zum zufälligen Kettenabbruch kommt. Die eingesetzte AmpliTaq® DNA-Polymerase FS ist eine Mutante der TaqPolymerase. Sie besitzt eine sehr geringe 5'-3' Nukleaseaktivität und baut auch ddNTP's in den synthetisierten DNA-Strang ein. Der Sequenzieransatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µL besteht aus 4 µL Terminationsmix (ddNTP; dNTP; Tris/HCl pH 9,0; MgCl₂; hitzestabile Pyrophosphatase; AmpliTaq®DNA-PolymeraseFS) 0,2-0,5 µL zu sequenzierende, doppelsträngige DNA, 30 pmol Oligonukleotid und eine entsprechende Menge an sterilem Wasser. Der Reaktionsansatz wird für 5 min bei 96 °C aufgekocht und in 25 Zyklen zunächst für 30 Sekunden auf 96 °C erhitzt, es folgt die Anlagerung der Oligonukleotide für 15 Sekunden bei 50 °C und die anschließende Polymerisation für 4 Minuten bei 60 °C. Die DNA-Fragmente wurden nach der Reaktion gefällt, um die nicht eingebauten Fluoreszein-gekoppelte ddNTP's zu entfernen. Jeder Sequenzieransatz wurde mit 80 µL dH₂O aufgefüllt, 250 µL Ethanol_{abs.} und 10 µL 3 M Natriumacetat (pH 5,0) zugesetzt und für 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde die gefällte Einzelstrang-DNA durch Zentrifugation bei 13.000 UpM für 30 min bei RT pelletiert, einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, kurz zentrifugiert (13.000 UpM, RT, 2 min) und anschließend unter Vakuum für 10 min getrocknet. Die gefällte DNA wurde in 4 µL Formamid/EDTA-Probenpuffer aufgenommen und vor dem Auftragen für 5 min bei 96 °C denaturiert. Die Sequenzierproben wurden in einem 5 %igen Polyacrylamidgel mit 7 M Harnstoff für zehn Stunden bei 1680 V, 50 mA und 51 °C aufgetrennt.

Sequenzierprobenpuffer

Formamid	80% (v/v)
Dextranblau	1% (v/v)
EDTA	5 mM

Polyacrylamid-Harnstoff-Gel

Harnstoff	21 g
30 % (w/v) Acrylamidlösung	8,4 mL
<i>aqua dest.</i>	20 mL
10 x TBE-Puffer (6.1.8)	6 mL
10 % (w/v) APS	300 µL
TEMED	20 µL

6.2 Zellbiologische Methoden**6.2.1 Zellkulturtechnik**

Die verwendeten Zelllinien wurden in Brutschränken mit einer konstanten Temperatur von 37 °C und unter 5 % CO₂-Atmosphäre als einschichtiger Zellrasen in 1x Dulbecco's MEM kultiviert. Als Kulturgefäße wurden Zellkulturflaschen der Fa. Costar verwendet. Zur Passagierung wurden die konfluent gewachsenen Zellen nach Entfernen des Kulturmediums einmal mit PBS_{def} gewaschen und durch Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, vereinzelt und in einem für jede Zellart spezifischen Verhältnis bezüglich der Fläche ausgesät.

6.2.2 Einfrieren und Auftauen von eukaryontischen Zellen

Subkonfluente Zellmonolayer wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, vereinzelt und mit 1 x Dulbecco's MEM mit 10% FKS versetzt. Die Zellen wurden bei 4 °C für 5 min mit 500 x g abzentrifugiert und in 2 mL 1x Dulbecco's MEM mit 10% FKS und 10% DMSO aufgenommen und je 1 mL in ein Polypropylenröhrchen der Fa. Costar gegeben. Um die Zellen kontinuierlich herunterzukühlen, wurden sie 24 Stunden in Isopropanol-gefüllten Gefrierbehältern bei -80 °C gelagert und anschließend über flüssigem Stickstoff (-196 °C) aufbewahrt. Eingefrorene Zellen (5×10^4)

wurden nach Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff sofort im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in eine 75 cm²-Zellkulturflaschen mit 15 mL Kulturmedium gegeben.

Kulturmedium

Dulbeccos`s MEM à la Brandl (2x)	500 mL/L
Fötales Kälberserum	100 mL/L
L-Glutamin 200 mM (100x)	10 mL/L
Penicillin/Streptomycin (100x)	10 mL/L
ad. aqua dest.	

6.2.3 Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryontischen Zellen

Für das Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryontische Zellen wurde Lipofektin (BRL Gibco) verwendet. Die Zellen wurden in Zellkulturschalen kultiviert, bis sie zu 80 % konfluent gewachsen waren. Das Transfektionsmedium setzte sich wie folgt zusammen:

Transfektionsmedium:

		Zellkulturschale	
		Ø 14,5 cm	Ø 1,8 cm
Lösung 1	Opti-MEM	5 mL	125 µL
	Plasmid-DNA	50 µg	0,8 µg
Lösung 2	Opti-MEM	5 mL	125 µL
	Lipofektin	50 µL	4 µL

Die Lösungen 1 und 2 wurden separat in Polystyrolröhrchen angesetzt, anschließend zusammengegeben und für 20 min bei RT zur Komplexbildung (Lipofektin-DNA) inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS_{def} gewaschen und das Transfektionsmedium auf die Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation von 6-16 Stunden. Danach wurde das Transfektionsmedium durch 1x Dulbecco´s MEM mit 1% FKS ersetzt und die transfizierten Zellen für weitere 24 Stunden inkubiert.

6.2.4 Biotinylierung von membranständigen Oberflächenproteinen eukaryontischer Zellen

Um den an der Zelloberfläche lokalisierten Anteil von der Gesamtmenge eines Proteins in der Zelle differenzieren zu können, ist eine Markierung der Oberflächenproteine vor der Proteinfractionierung notwendig. Zu diesem Zweck werden die Zellen mit Sulfo-NHS-Biotin behandelt. Dabei reagieren primäre Amine der Proteine in einer nukleophilen Addition mit dem N-Hydroxysulfosuccinimid (NHS)-Ester unter Abspaltung von N-Hydroxysulfosuccinimid. Da Biotin zwar nicht kovalent, jedoch mit sehr hoher Affinität an Avidin oder Streptavidin bindet, können Biotin-markierten Moleküle auf diese Weise nachgewiesen oder spezifisch gefällt werden. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C bzw. auf Eis vorgenommen, um weitere intrazelluläre Transportvorgänge zu verhindern. Der Zellrasen wurde zweimal mit eiskaltem PBS⁺⁺ gewaschen und zweimal 15 Minuten mit frisch gelöstem Biotin-NHS in PBS⁺⁺ (1 mg/mL) inkubiert (8 mL pro 165 cm²-Zellkulturschale). Anschließend wurde mit PBS⁺⁺ gewaschen und die ungebundenen Biotin-NHS-Reste während einer 10-minütigen Inkubation unter 50 mM Glycin in PBS⁺⁺ abgesättigt.

6.2.5 Zellfraktionierung von eukaryontischen Zellen

Die Methode nach Yang *et al.* (1997) erlaubt die fraktionierte Trennung von Membrankompartimenten eukaryontischer Zellen nach ihrer Proteinzusammensetzung. Eukaryontische Zellen wurden in einer 175 cm² Zellkulturflasche bis zur Konfluenz kultiviert (10⁷ Zellen), zweimal mit Puffer A gewaschen und in 5 mL Homogenisationspuffer geschabt. Die Zellen wurden bei 300 x g und 4 °C für 10 Minuten sedimentiert (Minifuge T, Heraeus, Hanau), in 300 µL Homogenisationspuffer resuspendiert und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Durch auf- und abziehen (12 x) durch eine 25 G Kanüle in einer 1 mL Spritze wurden die Zellen homogenisiert. Unlösliche Zellreste wurden bei 1000 x g bei 4 °C für zehn Minuten pelletiert (Microfuge 22 R, Hettich, Tuttlingen) und der Überstand in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt. Die Zellreste wurden ein zweites Mal mit 300 µL Homogenisationspuffer versetzt und der Vorgang

wiederholt. Die Überstände (600 µL) wurden vereinigt und auf einen kontinuierlichen 0-26 % OptiPrep(Iodixanol)-Gradienten in Puffer B aufgetragen. Die Fraktionierung der enthaltenen Membranen der verschiedenen Zellkompartimente fand während der anschließenden Zentrifugation bei 41000 UpM und 4 °C für 115 Minuten in einem SW41 Rotor statt (Ultrazentrifuge L7-55, Beckmann, Frankfurt/Main). Der Gradient wurde in 20 Fraktionen à 600 µL abgenommen. Jede Fraktion wurde mit 600 µL Puffer B versetzt und die Membranen bei 80000 x g pelletiert (Ultrazentrifuge TL 100, Beckmann, Frankfurt/Main). Die Pellets wurden in 20 µL 4 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und die Proteine in der SDS-PAGE (6.3.4) aufgetrennt und im Westernblot (6.3.5) analysiert.

6.2.6 Anreicherung von viralen Partikeln aus permanent BDV-infizierten Zellen

Permanent BDV-infizierte Zellen wurden in 30 Zellkulturflaschen (175 cm², je 10⁷ Zellen) konfluent kultiviert und die Zellkulturüberstände abgenommen. Die Zellen wurden zweimal mit 20 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) gewaschen und für 1,5 Stunden bei 37 °C unter 10 mL 20 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) mit 250 mM MgCl₂ und 1 % FKS (v/v) inkubiert. Durch diese Behandlung wird eine verstärkte BDV-Partikelfreisetzung induziert. Die Überstände wurden abgenommen und durch zweimaliges Zentrifugieren bei 2500 x g und 4 °C wurden die Zellreste sedimentiert (Minifuge T, Heraeus, Hanau). Die Viruspartikel wurden pelletiert in dem die gereinigten Überstände für 1 Stunde bei 20 °C und 80000 x g auf ein 20 %iges Saccharosekissen (w/w, in 20 mM HEPES-Puffer mit 1% FKS) zentrifugiert wurden (Ultrazentrifuge L7-55, Beckmann, Frankfurt/Main). Das Pellet wurde in 1 mL PBS_{def} resuspendiert und auf einen zweistufigen OptiPrep-Gradienten (v/v, 5 und 25% in PBS_{def}) geladen. Die resultierende Bande (gereinigte Virusfraktion), an der Phasengrenze, nach Zentrifugation für zwei Stunden bei 25000 UpM und 20 °C (Ultrazentrifuge L7-55, Beckmann, Frankfurt/Main) wurde mit einer Kanüle abgenommen.

6.2.7 Infektion von eukaryontischen Zellen mit dem Virus der Bornaschen Krankheit

Vero Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert, zweimal mit PBS_{def} gewaschen und für vier Stunden mit 50 µL Viruspräparation in 200 µL 1 x DMEM ohne FKS auf einem Schüttler inkubiert. Dann wurde das Medium durch 1 x DMEM mit 1 % FKS ersetzt und für vier Tage auf den Zellen belassen. Es folgte die Kontrolle der Infektion in der indirekten Immunfluoreszenz mit dem Nukleoprotein-spezifischen Antikörper Bo18 (6.3.9).

6.2.8 Metabolische Markierung von Proteinen eukaryontischer Zellen

Konfluent gewachsene eukaryontische Zellen (165 cm² Zellkulturschale, 10⁷ Zellen) wurden mit PBS⁺⁺ zweimal gewaschen, und für eine Stunde unter 1 x DMEM ohne FKS, Methionin und Cystein inkubiert um die Zellen bezüglich dieser Aminosäuren auszuhungern. Anschließend wurden die Zellen für drei Stunden mit diesem Medium und unter Zusatz von 50 µL Pro-MixTM Aminosäuregemisch mit L-[³⁵S]-Methionin und L-[³⁵S]-Cystein (14,3 mCi/mL, > 1000 Ci/mmol) pro Zellkulturschale inkubiert um in dieser Zeit synthetisierte Proteine metabolisch zu markieren. Die an der Zelloberfläche lokalisierten Proteine wurden anschließend entweder zunächst biotinyliert (6.2.4) oder die Zellen wurden direkt in 500 µL Lysepuffer (6.3.1) pro Zellkulturschale (165 cm²) aufgenommen und die Lysate zur Immunpräzipitation (6.3.1) eingesetzt.

6.3 Immunologische und Proteinchemische Methoden

6.3.1 Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Immunpräzipitation kann ein Protein aus einem Zelllysat selektiv mit einem entsprechenden spezifischen Antikörper gefällt werden. Die F_c-Ketten von Antikörpern binden an das bakterielle Protein A (aus *Staphylococcus aureus*), welches wiederum an die Trägermatrix Sepharose konjugiert ist. Auf diese Weise wird ein Komplex aus Protein-Antikörper und Protein-A-Sepharose (PAS) gefällt. Alle Schritte werden

bei 4 °C und unter Anwesenheit von Proteaseinhibitoren durchgeführt um proteolytischen Abbau zu vermeiden. 50 µL PAS wurden in einem Eppendorfgefäß dreimal mit 750 µL Lysepuffer gewaschen und mit je 0,25 µg anti-Maus Immunglobulinen vom Kaninchen (rb-anti-Maus) für zwei Stunden bei 4 °C vorinkubiert. Die Zellen wurden in Lysepuffer abgeschabt (1 mL/165 cm² Zellkulturschale), für 30 Minuten auf Eis inkubiert, mit 30 Impulsen bei 400 Watt beschallt (Sonifier B-12, Branson, Danbury, USA), unlösliche Aggregate durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 13000 UpM abgetrennt (Microfuge 22 R, Hettich, Tuttlingen) und die Überstände für zwei Stunden mit PAS-rb-anti-Maus vorgereinigt, um unspezifische Proteinbindungen zu minimieren. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 13000 UpM (Microfuge 22 R) wurde das Sediment verworfen und die so präadsorbierten Zelllysatüberstände auf 50 µL vorinkubierte PAS-rb-anti-mouse gegeben und 50 µL spezifischer Erstantikörper der Maus zugesetzt. Zur Bindung von Antigen-Antikörper-Komplexen an die beladene PAS wurden die Proben über Nacht bei 4 °C auf einem Rotator (Fa. Kreutz) inkubiert. Die sedimentierten Präzipitate wurden dreimal mit Lysepuffer gewaschen, in 30 µL 4 x SDS-Probenpuffer (6.3.4) aufgenommen und für fünf Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Im Falle von radioaktiven, ³⁵S-markierten Proben wurden 3 µL der Probe in 5 mL Szintillationsflüssigkeit gegeben und die Zerfälle pro Minute (CpM) in einem Szintillationszähler (Beckmann LS1801) gemessen.

Protein-A-Sepharose (PAS)

PAS	12,5% (w/v)
Natriumazid 10%	0,01% (v/v)
in <i>aqua dest.</i> ; über Nacht quellen lassen	

Lysepuffer (pH 7,4)

Tris	25 mM
Natriumchlorid	300 mM
Nonidet P-40	0,5% w/v
Desoxycholat	0,5% w/v
in <i>aqua dest.</i>	
Zusatz von Trasylol	100 U/mL

6.3.2 Lektinpräzipitation

Die Zellen wurden in GDK-1-Puffer mit 2 % SDS (w/v) geschabt, für 30 Minuten auf Eis inkubiert, mit 30 Impulsen (400 Watt) beschallt, unlösliche Aggregate durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 13000 UpM abgetrennt, 1 VT Zelllysate mit 9 VT GDK-1-Puffer gemischt, auf jeweils 50 µL Lektin-Sepharosekonjugate gegeben und über Nacht auf einem Rotator (Fa. Kreutz) bei 4 °C inkubiert. Die sedimentierten Präzipitate wurden dreimal mit GDK-1-Puffer gewaschen, in 3 µL 4 x SDS-Probenpuffer (6.3.4) aufgenommen, für fünf Minuten bei 95 °C aufgeköcht und entweder direkt in der SDS-PAGE (6.3.4) aufgetrennt oder einer Endoglykosidase Behandlung (6.3.3) unterzogen.

Um Proteine aus der Viruspräparation (6.2.6) zu präzipitieren, wurden 50 µL Virussuspension mit 50 µL GDK-1-Puffer mit 50 µL 2 % SDS (w/v) und 900 µL GDK-1-Puffer versetzt und mit 50 µL Lektin-Sepharosekonjugat über Nacht bei 4 °C auf einem Rotator bei 4 °C inkubiert. Mit den Präzipitaten wurde weiterverfahren wie oben beschrieben.

GDK-1-Puffer (pH 6,8)

Tris	50 mM
NaCl	150 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1 mM
in <i>aqua dest.</i>	

6.3.3 Endoglykosidase Behandlung

Die präzipitierten Proben wurden in 16 µL 4x SDS-Probenpuffer (6.3.4) für 15 min auf 95 °C erhitzt, für 5 min bei 13000 UpM zentrifugiert und der Überstand entweder mit 2 µL 10 x G-5 Puffer und 4 µL Endo H (Endo H-Verdau) oder mit 2 µL 10 x G7-Puffer und 2 µL 10 x NP-40 und 4 µL PNGase F (PNGase F-Verdau) versetzt und für zwei Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Proben wurden dann in der SDS-PAGE (6.3.4) aufgetrennt.

Endoglykosidase-Behandlung von Glykoproteinen an der Nitrozellulosemembran: Nach dem Übertrag der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran für 20 min in 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5,5)

auf dem Schüttler inkubiert und danach in einer feuchten Kammer für 16 Stunden auf 0,05 Einheiten Endoglykosidase H pro mL 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5,5) bei 37 °C inkubiert (Haselbeck *et al.*, 1992).

6.3.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine aus Zellextrakten, bzw. spezifisch präzipitierter Proteine nach ihrer molekularen Masse wurden SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet. SDS zerstört fast alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen. Zur Reduktion von möglichen Disulfidbrücken wurde β -Mercaptoethanol zugesetzt. Es wurde ein 11 %iges Polyacrylamidgel (Trenngel, 6 mL) gegossen und mit dem 3,75 %igem Polyacrylamidgel, das als Sammelgel dient, überschichtet (Gelgröße: 5,5 x 8 cm, Dicke 0,75 mm). Ein Kamm formte die Probetaschen im Sammelgel. Die Proteinproben wurden in einem entsprechenden Volumen 4 x Probenpuffer mit β -Mercaptoethanol aufgenommen und 5 min bei 96 °C aufgeköcht, anschließend kurz abzentrifugiert und in die Geltaschen aufgetragen. Als Marker zur Bestimmung der molekularen Masse wurde Rainbowmarker RPN800 (Fa. Amersham) verwendet. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE im 1 x SDS-Proteinlaufpuffer bei 150 V für 1,2 Stunden aufgetrennt.

10 X SDS-Laufpuffer		4 x SDS-Probenpuffer	
SDS	1 % (w/v)	SDS	0,04 % (w/v)
Tris	3 % (w/v)	1 M Tris/HCl (pH 6,8)	40 % (v/v)
Glycin	14,4 % (w/v)	Glycerin	40 % (v/v)
in aqua dest.		2 % Bromphenolblau	1 % (v/v)
		β -Mercaptoethanol	4 % (v/v)
		in aqua dest.	

	Trenngel 11%	Sammelgel 3,75%
Acrylamid Gel 30	7,3 mL	1,7 mL
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	5,0 mL	- -
1 M Tris/HCl pH 6,8	- -	3,4 mL
10 % (w/v) SDS	200 μ L	133 μ L
10 % (w/v) APS	200 μ L	53 μ L
TEMED	10 μ L	10 μ L

6.3.5 Elektrophoretische Übertragung von Proteinen auf Nitrozellulosemembran

Für den Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell, Ref. Nr. 401180) wurde das Halbtrockenblot-Verfahren nach Kyhse-Anderson (1984) verwendet. Der Transfer erfolgt während einer Stunde bei einer Stromstärke von 1 mA/cm² Gel. Proteinfreie Stellen auf der Nitrozellulosemembran wurden entweder sofort mit 3% bovines Serumalbumin in PBS_{def} + 0,1% Tween[®]20 (w/v) für mindestens eine Stunde auf einem Schüttler abgesättigt oder nach der Endoglykosidase-Behandlung der Proteine an der Membran (6.3.3).

Anodenpuffer I

1M Tris (pH 9,0)	30% (v/v)
Ethanol	20% (v/v)
in aqua dest.	

Kathodenpuffer

1 M Tris pH 9,0	2,5% (v/v)
Ethanol	20% (v/v)
ε-Aminocapronsäure	40 mM
in aqua dest.	

Anodenpuffer II

1M Tris (pH 7,4)	2,5% (v/v)
Ethanol	20% (v/v)
in aqua dest.	

6.3.6 Immunoblot

Auf der Nitrozellulosemembran gebundene Proteine wurden indirekt durch spezifische Primärantikörper nachgewiesen. Im Fall von biotinylierten Proben erfolgte der direkte Nachweis durch die hochaffine Bindung eines Streptavidin-Peroxidase-Komplexes. Die Nitrozellulosemembran wurde über Nacht in 3 % BSA in PBS_{def} (w/v) abgesättigt, dreimal für 10 Minuten in PBS_{def} mit 0,1 % TWEEN[®]20 (v/v) gewaschen und für eine Stunde mit dem spezifischen Erstantikörper 1:200-1:500 verdünnt in PBS_{def} mit 0,1% TWEEN[®]20 inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal in PBS_{def} mit 0,1 % TWEEN[®]20 gewaschen und mit dem Peroxidase-(POX)-gekoppelten Zweitantikörper (1:2000 verdünnt in PBS_{def} mit 0,1 % TWEEN[®]20), der gegen die F_c-Ketten des spezifischen Erstantikörpers

gerichtet ist, für eine Stunde inkubiert. Die Membran wurde für 15 Minuten in PBS_{def} mit 0,1 % TWEEN[®]20 und dreimal für fünf Minuten in PBS_{def} gewaschen. Der spezifische Nachweis erfolgt mittels Chemoluminiszenz-Nachweis (6.3.7). Für den Nachweis von biotinyliertem Protein mit Streptavidin-POX wurde entsprechend der oben beschriebenen Methode vorgegangen, da es sich jedoch um einen direkten Nachweis handelt, entfällt die Inkubation mit einem Zweitantikörper.

6.3.7 Der Chemoluminiszenz-Nachweis

Die an die Zweitantikörper bzw. an Streptavidin gekoppelte Peroxidase (POX) wurde durch Chemoluminiszenz mit dem „SuperSignal[®]West Dura Extended Duration Substrate“ (Fa. Pierce) nachgewiesen. Dabei wird dem Enzym als Substrat ein cyclisches Diacylhydrazid (Luminol) angeboten, das von POX oxidiert wird und dessen Elektronen in einen angeregten Zustand überführt. Beim Übergang in den Grundzustand wird die freiwerdende Energie als Licht emittiert. Dieses Licht wiederum kann einen Röntgenfilm (Biomax MR, Kodak) schwärzen. Auf diese Weise lässt sich das spezifisch gebundene Protein auf dem Westernblot lokalisieren und seine molekulare Masse anhand des Rainbow-Proteingrößen Standards näherungsweise ableiten.

6.3.8 Autoradiographie

Radioaktiv markierte Proteine wurden nach Übertragung auf Nitrozellulosemembran durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Membran wurde getrocknet und für 1 bis 16 Stunden auf eine Phosphor-Imager Platte (IP BAS III) aufgelegt. Nach der Exposition wurden die Signale auf der IP-Platte am „Fuj BAS 1000 Bio Imaging Analyzer“ (Fa Raytest) digitalisiert und mit Hilfe der TINA-Software (Fa. Raytest) dargestellt und ausgewertet. Die Nitrozellulosemembran kann für weitere Untersuchungen, beispielsweise immunologische Untersuchungen, rehydriert werden.

6.3.9 Nachweis von Proteinen durch indirekte Immunfluoreszenz

Diese mikroskopische Methode basiert auf einem spezifisch immunologischen Nachweis von zellulären oder viralen Antigenen in Zellen. Auf diese Weise kann die intrazelluläre Lokalisation in den verschiedenen Zellkompartimenten des jeweiligen Proteins gezeigt werden, sowie sein Vorhandensein an der Zelloberfläche. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80 % auf Deckgläschen, die in Kulturschalen ausgelegt waren, kultiviert.

Immunfluoreszenz an fixierten, permeabilisierten Zellen:

Die Deckgläschen wurden in 24-well-Kulturplatten transferiert, zweimal mit eiskaltem PBS⁺⁺ gewaschen und auf Eis für 10 Minuten mit je 250 µL Methanol:Aceton (1VT:1VT) fixiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS^{def} gewaschen. Durch die Behandlung mit Methanol/Aceton findet neben der Fixierung auch eine Permeabilisierung der Zellen statt. Der immunologische Nachweis beginnt mit der Inkubation der Zellen mit einem spezifischen Erstantikörper in einer Verdünnung von 1:100 bis 1:200 in PBS^{def} mit 0,1% BSA für eine Stunde. Anschließend wurde das Glasplättchen dreimal mit PBS^{def} gewaschen und es folgte die Inkubation mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper, der gegen die F_c-Ketten des spezifischen Erstantikörpers gerichtet war. Dieser Zweitantikörper wurde 1:200 in PBS^{def} mit 0,1% BSA verdünnt, und die mit dem Erstantikörper behandelten Zellen damit für eine Stunde dunkel inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen für fünf Minuten mit 10⁻³ mM DAPI in *aqua dest.* inkubiert und mit *aqua dest.* gespült, um störende Salze zu entfernen und auf Filterpapier abgetropft. Es folgte das Eindeckeln der Deckgläschen auf Objektträgern in Mowiol (10 µL). Nach dem die Eindeckflüssigkeit für etwa eine Stunde getrocknet wurde, sind die Präparate, dunkel und kühl gelagert, für Monate haltbar.

Immunfluoreszenz an unfixierten lebenden Zellen:

Mit dieser Methode werden unpermeabilisierte Zellen untersucht. Um Transportvorgänge in der Zelle zu unterbinden, wurden die Zellen für 30 Minuten auf Eis heruntergekühlt und alle weiteren Schritte bei 4°C durchgeführt. Die Deckgläschen wurden in 24-well-Kulturplatten

transferiert, zweimal mit eiskaltem PBS⁺⁺ gewaschen und auf Eis für 60 Minuten mit je 250 µL mit einem spezifischen Erstantikörper in einer Verdünnung von 1:100 in PBS⁺⁺ inkubiert. Anschließend wurde das Glasplättchen dreimal mit eiskaltem PBS⁺⁺ gewaschen und es folgte die Inkubation mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper, der gegen die F_c-Ketten des spezifischen Erstantikörpers gerichtet war. Dieser Zweitantikörper wurde 1:100 in PBS⁺⁺ verdünnt und die mit dem Erstantikörper behandelten Zellen damit für eine Stunde auf Eis dunkel inkubiert. Die Kontrollfärbung der Zelloberfläche (Darstellung von GM1) erfolgte mit Cholera Toxin (Untereinheit B) das Biotin gekoppelt war (Verdünnung 1:75) und mit Fluoreszein gekoppelten Streptavidin (Verdünnung 1:100) in einer zweiten Inkubation markiert wurde. Die Deckgläschen wurden auf Objektträgern in Mowiol (10 µL) eingedeckelt. Nachdem die Eindeckflüssigkeit für etwa eine Stunde getrocknet wurde, sind die Präparate, dunkel und kühl gelagert, für Monate haltbar.

Herstellung des Eindeckmediums: Es wurden 2,4 g Mowiol 4-88 und 6 g Glycerin in 6 mL entionisiertem Wasser über Nacht gequollen, 12 mL 0,2 M Tris-Puffer (pH 8,5) dazugegeben und der Ansatz unter Rühren bei 50 bis 60 °C erhitzt, bis sich alle Komponenten gelöst hatten. Es folgte die Zentrifugation bei 4000 UpM für fünfzehn Minuten. Der klare Überstand wurde mit 10 % (w/v) DABCO versetzt. Das fertige Eindeckmedium wurde aliquotiert bei -20 °C gelagert.

7 Ergebnisse

7.1 Die Identifizierung des N-terminalen Spaltprodukts GP-N

Das N-terminale Spaltprodukt GP-N, das nach der Aktivierung des GP-Vorläufers entsteht, konnte mit einer Kombination aus quantitativer Anreicherung mittels Lektin-Sepharosekonjugaten und anschließender Optimierung der Erkennung durch spezifische Anti-Peptidseren erstmalig in permanent BDV-infizierten Zellen identifiziert werden. Da das Glykoprotein GP aufgrund seines hohen Verzuckerungsgrads nur sehr geringe antigene Eigenschaften besitzt, gestaltet sich die Herstellung geeigneter Antiseren vergleichsweise schwierig. Die Gewinnung von GP-reaktiven Antiseren aus infizierten Tieren ist daher nicht möglich. Aus diesem Grund wurden Kaninchen mit aus der C-terminalen und N-terminalen Aminosäuresequenz des GP abgeleiteten Peptiden immunisiert. Es wurden zwei Anti-Peptidseren, Rb- α GP-C und Rb- α GP-N, generiert (Abbildung 5A), die in der Lage sein sollten das Vorläufermolekül GP und die jeweiligen Spaltfragmente zu erkennen. Anti-Peptidseren haben den Nachteil, dass sie keine Spezifität für die Konformation im nativen Protein besitzen, dass heißt, dass nur lineare Epitope nachgewiesen werden können. Sie sind außerdem ungeeignet für den direkten Nachweis von modifizierten, glykosylierten Proteinen, da möglicherweise antigene Aminosäuresequenzen im Protein verdeckt sind und damit eine effiziente Erkennung durch das Anti-Peptidserum behindert werden könnte.

7.1.1 Identifizierung des N-terminalen Spaltfragments in permanent BDV-infizierten Zellen

Der immunologische Nachweis des BDV-Glykoproteinvorläufers GP und der Spaltprodukte wurde zunächst an Zelllysaten permanent BDV-infizierter Vero Zellen im Westernblot durchgeführt. Hierbei wurden die Anti-Peptidseren Rb- α GP-C und Rb- α GP-N verwendet (Abbildung 5A). Permanent BDV-infizierte Vero Zellen wurden in SDS-Probenpuffer

aufgenommen, die Zelllysatsproteine in der SDS-PAGE (6.3.4) elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulosemembran übertragen (6.3.5). Der Nachweis erfolgte jeweils mit dem Anti-Peptidserum Rb- α GP-C oder Rb- α GP-N im Westernblot (6.3.6). Das Anti-Peptidserum gegen das C-terminal gelegene Epitop erkennt sowohl den Vorläufer GP mit einer molekularen Masse von 94 kDa, als auch das Spaltprodukt GP-C mit einer molekularen Masse von 43 kDa (Abbildung 5B, Spur 2). Mit dem Anti-Peptidserum spezifisch für den N-terminalen Bereich lässt sich lediglich das ungespaltene GP darstellen. Das N-terminale Spaltprodukt GP-N, das eine errechnete molekulare Masse von 51 kDa hat, konnte auf diese Weise nicht identifiziert werden (Abbildung 5B, Spur 4). Als Kontrolle dienten uninfizierte Vero Zellen (Abbildung 5B, Spur 1 und 3).

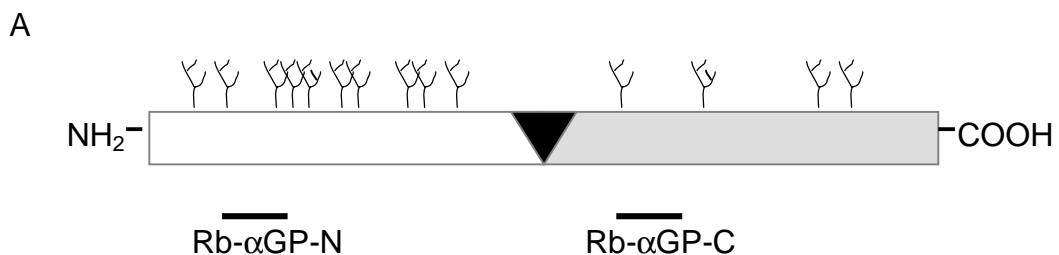


Abbildung 5A: Übersicht zu den antigenen Bereichen der Anti-Peptidseren Rb- α GP-C und Rb- α GP-N im Glykoprotein GP des Virus der Bornaschen Krankheit. Die eingezeichneten Bäumchen zeigen die Verteilung der potentiellen N-Glykosylierungsstellen an. Das schwarze Dreieck zeigt die tetrabasische Spaltstelle (RRRR), weiß ist der N-terminale, grau ist der C-terminale Bereich des ungespaltenen GP-Vorläufermoleküls dargestellt.

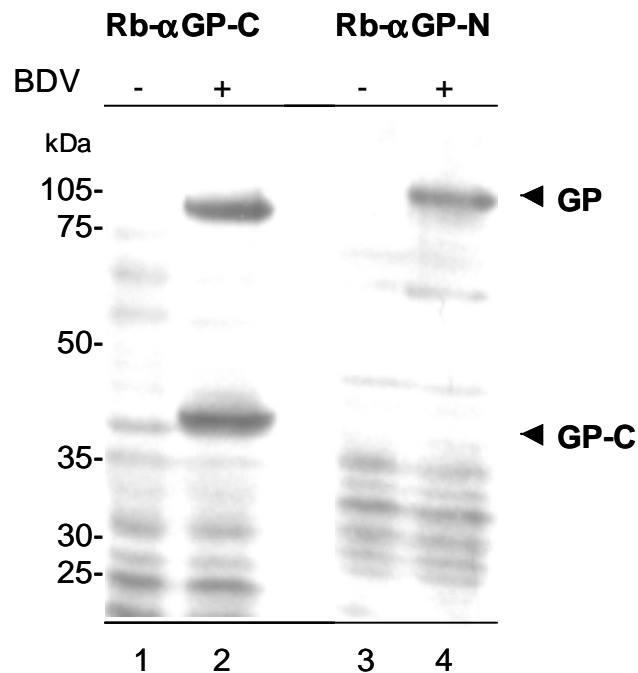


Abbildung 5B: Erkennung des BDV-Glykoproteins durch die Anti-Peptidseren Rb- α GP-C und Rb- α GP-N im Westernblot. Permanent BDV-infizierte Vero Zellen werden lysiert, die Proteine in der SDS-PAGE (11%) elektrophoretisch (6.3.4) aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen (6.3.5) und im Westernblot (6.3.6) mit einem Anti-Peptidserum gegen den C-terminalen (Spur 1 und 2) bzw. den N-terminalen (Spur 3 und 4) Anteil des BDV-GP behandelt. GP, das ungespaltenes Vorläufermolekül, und GP-C, das C-terminales Spaltprodukt, werden durch die Pfeilspitzen markiert. Näherungsweise Bestimmung der molekularen Masse mit dem „Rainbowmarker“ RPN800 (5.1).

Damit stellte sich die Frage, ob das GP-N nicht nachgewiesen werden konnte, weil es in unzureichenden Mengen vorhanden war, schnell nach seiner Entstehung noch in der Zelle degradiert wurde oder aber das Anti-Peptidserum durch die in der Nachbarschaft der immunogenen Region vorhandenen N-Glykane in seiner Bindung behindert wurde. Um sicherzustellen, dass das N-terminale Spaltfragment GP-N in hinreichenden Mengen für einen Nachweis im Westernblot zur Verfügung steht, wurden Lektin-Sepharosekonjugate zur Anreicherung der glykosylierten Zellproteine eingesetzt (siehe Übersicht in Tabelle 1). Lektine sind (Glyko-) Proteine, die spezifisch an definierte Mono-, Di- oder Oligosaccharide binden (Definition nach Boyd, 1962).

Lektin	Bindungsspezifität	GP	GP-C	GP-N
ConcanavalinA (ConA)	α -D-Mannosyl-R; α -D-Glucosyl-R	+	+	+
<i>Galanthus nivalis</i> Agglutinin (GNA)	nicht reduzierte, terminale α -D-Mannosyl-R	+	+	+
Wheat Germ Agglutinin (WGA)	N-Acetyl- β -D-Glykosyl-R/-Oligomere	+	+	+
<i>Helix pomatia</i> (HP)	terminale N-Acetyl- α -D-galaktosaminy-R	–	–	–
Jacalin (Jac)	α -D-Galaktosyl-R	–	–	–
Soybean (Soy)	N-Acetyl- β -D-Glycosamine Oligomere	+	+	n.d.
<i>Ulex europaeus</i> UEAI	L-Fucose-R	–	–	–

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Lektine, ihrer Bindungsspezifität und fällbare Anteile des BDV-Glykoproteins. GP, das ungespaltenes Vorläuferprotein; GP-C, das C-terminale Spaltprodukt; GP-N, das N-terminale Spaltprodukt; n.d., nicht detektierbar; R, der N-Glykanrest.

Die angereicherten Glykoproteine (6.3.2) wurden in einer SDS-PAGE (6.3.4) aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulosemembran übertragen. Um eine mögliche Maskierung des antigenen Bereichs durch die benachbarten N-Glykane des GP-N auszuschließen (siehe auch Abbildung 5A), wurde die Nitrozellulosemembran einer Endoglykosidase H Behandlung unterzogen. Dabei werden die mannosereichen N-Glykane vom Protein abgespalten und dadurch das Epitop der antigenen Peptidsequenz freigelegt (6.3.3). Die BDV-Glykoproteinanteile wurden im Westernblot (6.3.6) mit Rb- α GP-C oder Rb- α GP-N spezifisch nachgewiesen (Abbildung 6). Der Vorläufer GP und seine Spaltprodukte, GP-C und erstmals auch GP-N, konnten aus Zelllysaten permanent BDV-infizierter Zellen unter Verwendung von Concanavalin A (ConA; Lotan *et al.*, 1977), *Galanthus nivalis* Agglutinin (GNA; Shibuya *et al.*, 1988) und Wheat Germ Agglutinin (WGA; Lotan *et al.*, 1977) angereichert werden. Diese Lektine sind in der Lage die Zuckerstrukturen von GP, GP-C und GP-N zu binden. Auf diese Weise gelang es das bis dato noch nicht in viralem Kontext darstellbare GP-N zu identifizieren. Wegen seines hohen N-Glykangehalts läuft es in der SDS-PAGE als diffuse Bande.

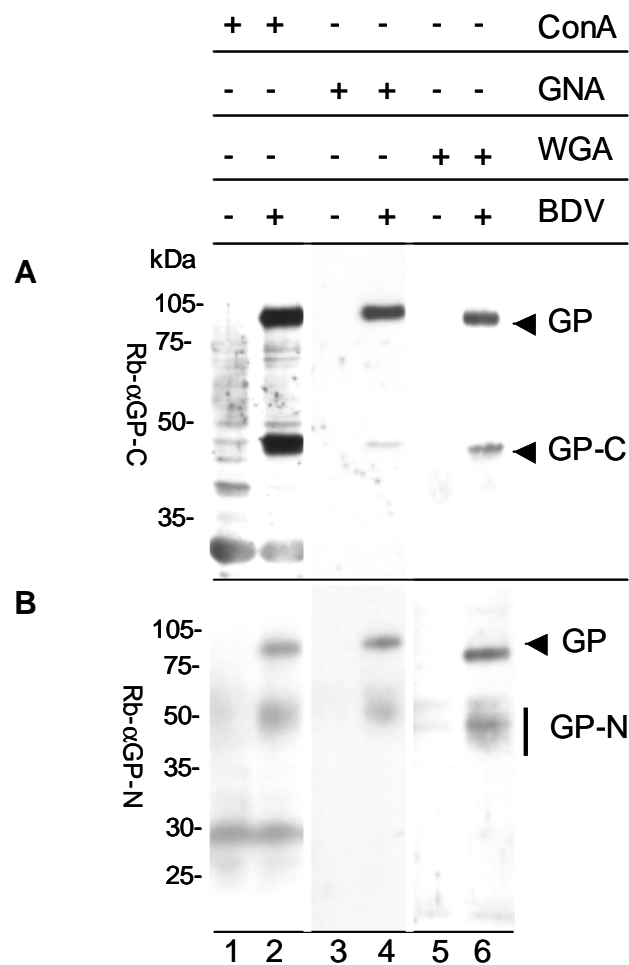


Abbildung 6: Identifizierung des N-terminalen Spaltprodukts GP-N. Permanent BDV-infizierte MDCK Zellen (Spur 2, 4 und 6) und nicht-infizierte MDCK Zellen als negativ Kontrolle (Spur 1, 3 und 5) wurden lysiert, diese Zelllysate mit den Lektin-Sepharosekonjugaten ConA (Spur 1 und 2, Concanavalin A), GNA (Spur 3 und 4, *Galanthus nivalis* Agglutinin) und WGA (Spur 5 und 6, Wheat Germ Agglutinin) inkubiert (6.3.2), die präzipitierten Glykoproteine in einer 11%igen SDS-PAGE aufgetrennt (6.3.4) und auf Nitrozellulosemembran übertragen (6.3.5): **Westernblot A:** Nachweis der BDV-spezifischen Glykoproteinanteile mit dem C-Terminus bindenden Rb-αGP-C. **Westernblot B:** Nachweis der spezifischen Glykoproteinanteile mit dem N-Terminus bindenden Rb-αGP-N (6.3.6) auf der mit Endoglykosidase H behandelten Membran (6.3.3). Die Pfeile markieren GP, das ungespaltene Vorläufermolekül und GP-C, das C-terminale Spaltprodukt. Der Balken markiert den Bereich der diffusen Bande des hoch glykosylierten Spaltfragments GP-N. Näherungsweise Bestimmung der molekularen Masse mit dem „Rainbowmarker“ (5.1).

In Folge wurden die N-Glykane von BDV-GP, GP-C und GP-N näher charakterisiert. Die Glykoproteinanteile permanent BDV-infizierter MDCK Zellen wurden mit GNA-Sepharosekonjugat präzipitiert (6.3.2) und anschließend mit Endoglykosidasen (6.3.3) behandelt. Danach wurden die Proben in der SDS-PAGE aufgetrennt (6.3.4) und auf Nitrozellulose übertragen (6.3.5). Die BDV-spezifischen Glykoproteinanteile wurden mit dem C- bzw. dem N-Terminus spezifischen Anti-Peptidserum im Westernblot (6.3.6) nachgewiesen, um das resultierende Laufverhalten von GP, GP-C und GP-N zu analysieren (Abbildungen 7A und 7B).

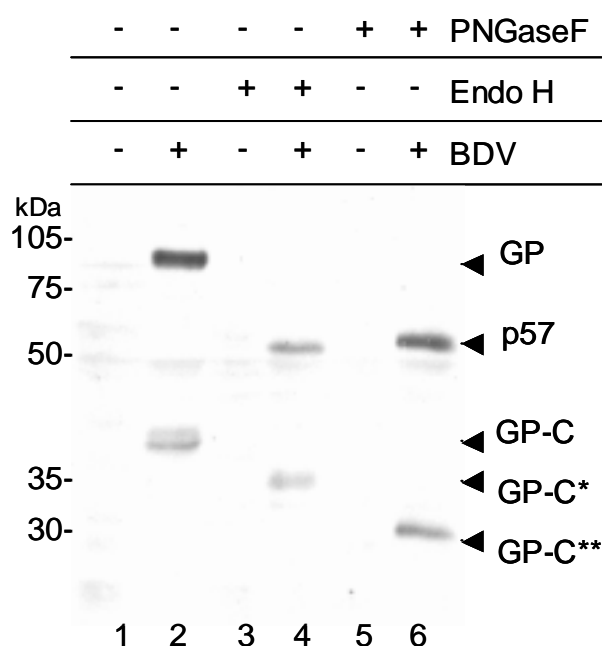


Abbildung 7A: Charakterisierung der N-Glykane des C-terminalen Spaltprodukts GP-C des BDV-Glykoproteins. Permanent BDV-infizierte MDCK Zellen (Spur 2, 4 und 6) und nicht infizierte MDCK Zellen als negativ Kontrolle (Spur 1, 3 und 5) wurden lysiert, diese Zelllysate mit GNA-Sepharosekonjugaten (*Galanthus nivalis* Agglutinin) inkubiert (6.3.2), die präzipitierten Glykoproteine mit Endoglykosidase H (Spur 3 und 4, Endo H) oder Peptid-N-glykosidase F (Spur 5 und 6, PNGase F) behandelt (6.3.3), in einer 11 %igen SDS-PAGE aufgetrennt (6.3.4), auf Nitrozellulosemembran übertragen (6.3.5) und die BDV-spezifischen Glykoproteinanteile mit dem C-Terminus bindenden Rb- α GP-C im Westernblot nachgewiesen (6.3.6). GP, das ungespalte Vorläufermolekül, p57, das unglykosylierte Vorläufermolekül, GP-C, das C-terminale Spaltprodukt, GP-C*, das Endoglykosidase H (EndoH) resistente C-terminale Spaltprodukt und GP-C**, das vollständig unglykosylierte C-terminale Spaltfragment werden durch Pfeilspitzen markiert. Näherungsweise Bestimmung der molekularen Masse mit dem „Rainbowmarker“ (5.1).

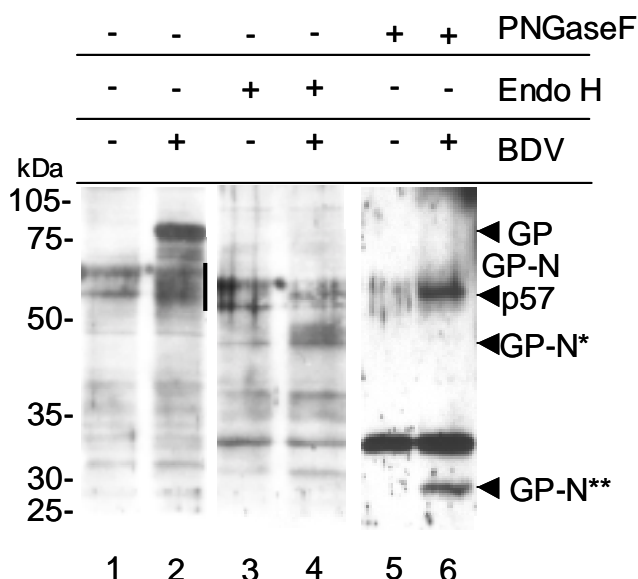


Abbildung 7B: Charakterisierung der N-Glykane des N-terminalen Spaltprodukts GP-N des BDV-Glykoproteins. Permanent BDV-infizierte MDCK Zellen (Spur 2, 4 und 6) und nicht infizierte MDCK Zellen als negative Kontroll (Spur 1, 3 und 5) wurden lysiert, diese Zelllysate mit GNA-Sepharosekonjugat (*Galanthus nivalis* Agglutinin) inkubiert (6.3.2), die präzipitierten Glykoproteine mit Endoglykosidase H (Spur 3 und 4, Endo H) oder Peptid-N-glycosylidase F (Spur 5 und 6, PNGase F) behandelt (6.3.3), in einer 11 %igen SDS-PAGE aufgetrennt (6.3.4), auf Nitrozellulosemembran übertragen (6.3.5), die Nitrozellulosemembran mit Endo H behandelt (6.3.3) und die BDV-spezifischen Glykoproteinanteile mit dem N-Terminus bindenden Rb- α GP-N im Westernblot nachgewiesen (6.3.6). Die Pfeilspitzen markieren: GP, das ungespaltene Vorläufermolekül; p57, das unglykosylierte Vorläufermolekül; GP-N*, das Endoglykosidase H (EndoH) resistente N-terminale Spaltprodukt; GP-N**, das vollständig unglykosylierte N-terminale Spaltfragment; der Balken markiert GP-N, das N-terminale Spaltungsprodukt. Näherungsweise Bestimmung der molekulare Masse mit dem „Rainbowmarker“ (5.1).

In beiden Untersuchungen (Abbildung 7A und 7B, je Spur 4) hat sich gezeigt, dass die N-Glykane der Spaltprodukte zum Teil resistent gegenüber einer Endoglykosidase H Behandlung sind. Dieses Enzym spaltet mannosereiche, N-glykosidisch gebundene Glykane vom Protein ab. Das ungespaltene GP ist demgegenüber vollständig mit mannosereichen N-Glykanen ausgestattet. Eine Endo H Behandlung hat eine Verringerung der molekularen Masse von 94 kDa auf 57 kDa zur Folge. Das entspricht dem unmodifizierten Polypeptid p57. Eine vollständige Deglykosylierung der Spaltprodukte des BDV-Glykoproteins

findet nur durch eine Behandlung mit PNGase F statt. Dadurch wird die Gesamtheit an N-glykosidisch gebundenen Glykanen abspalten, was durch das veränderte Laufverhalten der Spaltfragmentbanden deutlich wird. Das GP-C besitzt demnach nur noch eine molekulare Masse von 30 kDa (GP-C**) und die molekulare Masse von GP-N sinkt auf 27 kDa (GP-N**). Dieses entspricht den unverzuckerten Polypeptiden der Spaltprodukte des BDV-GP (Abbildungen 7A und 7B, je Spur 6). Das ungespaltene GP erreicht nach Abspaltung aller N-glykosidisch gebundenen Glykane durch PNGase F die molekulare Masse von 57 kDa (p57).

7.1.2 Nachweis des BDV-Glykoproteins in einer virusangereicherten Präparation

Die Glykoproteinanteile in infektiösen Partikeln des Virus der Bornaschen Krankheit wurden an einer Präparation von BDV-Partikeln aus Zellüberständen von permanent BDV-infizierten MDCK Zellen untersucht. Das Virus wird nur in geringen Mengen freigesetzt. Daher müssen konfluent gewachsene, permanent BDV-infizierte Zellen mit einem osmotischen Schock zur verstärkten Freisetzung von viralen Partikeln angeregt werden. Dass es sich dabei um infektiöse Partikel handelt, wurde in einem Infektionsexperiment überprüft (Abbildung 8). Uninfizierte Vero Zellen wurden mit der BDV-angereicherten Präparation inkubiert (6.2.7) und die Zellen auf eine mögliche Infektion mit einem BDV-Nukleoprotein spezifischen Antikörper in der indirekten Immunfluoreszenz (6.3.9) getestet.

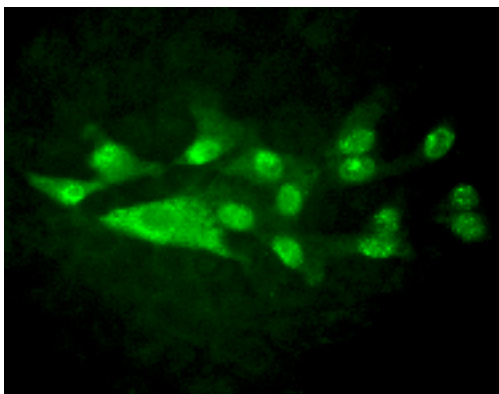


Abbildung 8: Infektionskontrolle der BDV-angereicherten Präparation aus Überständen BDV-infizierter MDCK Zellen. Vero Zellen wurden auf Glasplättchen kultiviert, mit einer BDV-Präparation aus permanent BDV-infizierten MDCK Zellen inkubiert (6.2.7), fixiert und BDV in der indirekten Immunfluoreszenz (6.3.9) mit dem BDV-Nukleoprotein-spezifischen mab Antikörper Bo18 nachgewiesen.

Die BDV-Präparation wurde mit GDK-1-Puffer versetzt, die Glykoproteinanteile mit GNA-Sepharosekonjugat präzipitiert (6.3.2), die gefällten Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt (6.3.5) und auf Nitrozellulosemembran übertragen. Im Falle des Nachweises des N-terminalen Spaltprodukts wurde die Membran mit Endoglykosidase H behandelt (6.3.3) und die präzipitierten Proteine im Westernblot (6.3.5) mit den Anti-Peptidseren Rb- α GP-C oder Rb- α GP-N untersucht (Abbildung 9).

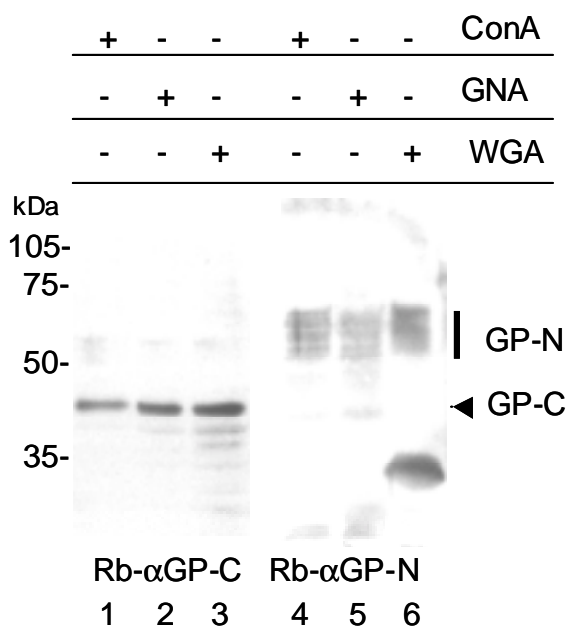


Abbildung 9: Nachweis der BDV-Glykoproteinanteile in einer BDV-angereicherten Präparation. Eine BDV-Präparation aus permanent infizierten MDCK Zellen wurde mit den Lektin-Sepharosekonjugaten ConA (Spur 1 und 4, Concanavalin A), GNA (Spur 2 und 5, *Galanthus nivalis* Agglutinin) und WGA (Spur 3 und 6, Wheat germ Agglutinin) inkubiert (6.3.2), die präzipitierten Glykoproteine in einer 11%igen SDS-PAGE aufgetrennt (6.3.4), auf Nitrozellulosemembran übertragen (6.3.5), die Nitrozellulosemembran im Falle des N-terminalen Spaltprodukts (Spur 4-6) mit Endo H behandelt (6.3.3) und die BDV-spezifischen Glykoproteinanteile mit dem C-Terminus bindenden Rb- α GP-C (Spur 1-3) oder dem N-Terminus bindenden Rb- α GP-N (Spur 4-6) im Westernblot nachgewiesen (6.3.6). GP-C, das C-terminale Spaltprodukt, wird durch die Pfeilspitze und GP-N, das N-terminale Spaltprodukt, mit einem Balken markiert. Näherungsweise Bestimmung der molekularen Masse mit dem „Rainbowmarker“ (5.1).

Die drei in Abbildung 9 genannten Lektine binden sowohl das C-terminale Spaltprodukt GP-C, als auch das N-terminale Spaltprodukt GP-N.

Letzteres zeigt, wie auch unter 7.1.1 beschrieben, ein diffuses Laufverhalten in der SDS-PAGE. Das GP-C besitzt eine molekulare Masse von 43 kDa.

Um sicher zu stellen, dass es sich bei dieser diffusen Bande auch tatsächlich um GP-N handelt, wurden die N-Glykane abgespalten. Die Lektinpräzipitate wurden mit Peptid-N-glykosidase F (PNGase F) behandelt (6.3.3) und die Proteine im Westernblot (6.3.6) mit dem Anti-Peptidserum Rb- α GP-N nachgewiesen. Die Abspaltung der N-Glykane des GP-N resultiert in einer Verschiebung der diffusen Bande (50-60 kDa; Abbildung 9, Spur 4 bis 6) auf eine distinkte Bande mit der zu erwartenden molekulare Masse von 27 kDa für das vollständig deglykosylierte GP-N (Abbildung 10, Spur 1 bis 3). Damit konnte erstmals die Zusammenstellung der BDV-Glykoproteinanteile in der viralen Hüllmembran geklärt werden. In diesen Untersuchungen ist das ungespaltene GP-Molekül in der Hüllmembran des Virus nicht nachweisbar.

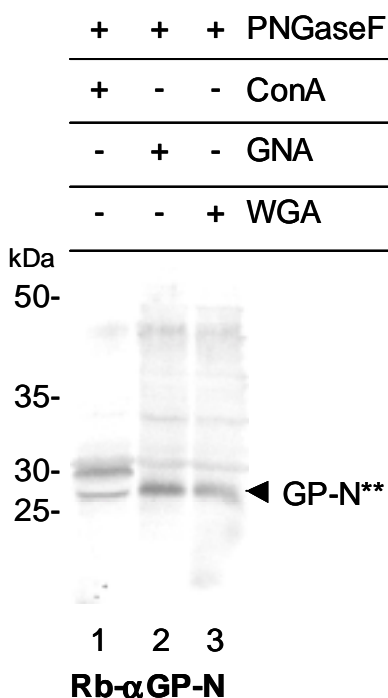


Abbildung 10: Das unglykosylierte N-terminale Spaltprodukt GP-N in einer BDV-angereicherten Präparation (Abbildungstext siehe folgende Seite).

Abbildung 10 (vorhergehende Seite):

Das unglykosylierte N-terminale Spaltprodukt GP-N in einer BDV-angereicherten Präparation. Eine BDV-Präparation aus permanent BDV-infizierten MDCK Zellen (6.2.7) wurde mit den Lektin-Sepharosekonjugaten ConA (Spur 1, Concanavalin A), GNA (Spur 2, *Galanthus nivalis* Agglutinin) und WGA (Spur 3, Wheat Germ Agglutinin) inkubiert, die präzipitierten Glykoproteine mit Peptid-N-glykosidase F (PNGase F) behandelt (6.3.3), in einer 11 %igen SDS-PAGE aufgetrennt (6.3.4), auf Nitrozellulosemembran übertragen (6.3.5) und die BDV-spezifischen Glykoproteinanteile mit dem N-Terminus bindenden Rb- α GP-N (Spur 1-3) im Westernblot (6.3.6) nachgewiesen. Der Pfeil markiert GP-N**, das vollständig unglykosylierte, N-terminale Spaltfragment. Näherungsweise Bestimmung der molekularen Masse mit dem „Rainbowmarker“ (5.1).

7.2 Der Intrazelluläre Transport des BDV-Glykoproteins

Die Spaltung des BDV-Glykoproteins GP und sein intrazellulärer Transportweg sind miteinander gekoppelt. Daher wurde in einer Zellfraktionierung (6.2.5) die intrazelluläre Lokalisation von GP und GP-C untersucht. Dabei wurden die Membranen der Zellkompartimente permanent BDV-infizierter, homogenisierter Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Protein- und Lipidzusammensetzung in einem kontinuierlichen OptiPrep-Gradienten aufgetrennt. Anschließend wurde der Gradient in Fraktionen abgenommen und diese auf ihre Proteinzusammensetzung hin untersucht. Es wurden zwei zelluläre, Kompartiment-spezifische Markerproteine verwendet: BiP als Markerprotein für das endoplasmatische Retikulum (Hammond und Helenius, 1994) und das Golgi-Markerprotein 130 kDa (GM130; Nakamura *et al.*, 1995). Beide waren dominant in unterschiedlichen Fraktionen des Gradienten nachweisbar (Abbildung 11, mittleres und unteres Bild).

Parallel dazu wurden die Fraktionen auf die Anwesenheit von ungespaltenem GP und gespaltenem GP-C mit dem C-Terminus spezifischen Anti-Peptidserum Rb- α GP-C analysiert (Abbildung 11, oberes Bild). Das BiP-Protein (ER) befindet sich dominant in den Fraktionen 4 bis 9 (Abbildung 11, mittleres Bild). Der Hauptanteil der Membranen des Golgi-Apparats befinden sich in den oberen Fraktionen 16 bis 20 des Gradienten und zu geringeren Anteilen in den ER-nahen Fraktionen 9 und 10, wie durch die Anwesenheit des GM130 gezeigt werden konnte (Abbildung 11, unteres Bild). Mit diesen Nachweisen von subzellulären Markerproteinen konnte die Identifizierung des Glykoproteins GP und seines Spaltprodukts GP-C verglichen werden. In Fraktion 4 ist noch ein sehr schwaches Signal des ungespaltenen Vorläufermoleküls zu erkennen, das sich in Fraktion 5 deutlich verstärkt. Das GP ist bis zur intermediären Fraktion 9 gut nachweisbar. Danach, im Übergang zu den Fraktionen des Golgi-Apparats (Fraktion 10), tritt es in wesentlich geringeren Mengen auf. Das C-terminale Spaltfragment GP-C lässt sich in Fraktion 5 erstmals nachweisen. Dieses Signal verstärkt sich kontinuierlich bis zur Fraktion 9 und ist bis zur Fraktion 12 in abgeschwächter Form zu detektieren. Dieses Ergebnis zeigt, dass das Glykoprotein schon im zellulären Kompartiment des endoplasmatischen Retikulums, bzw. in einem frühen cis-Golgi-Kompartiment gespalten vorliegt. Sowohl GP als auch GP-C ist in den Fraktionen des Golgi-Apparats in vergleichsweise geringen Quantitäten nachzuweisen. Beide Glykoproteinformen akkumulieren vorwiegend im endoplasmatischen Retikulum oder in ER-nahen Kompartimenten.

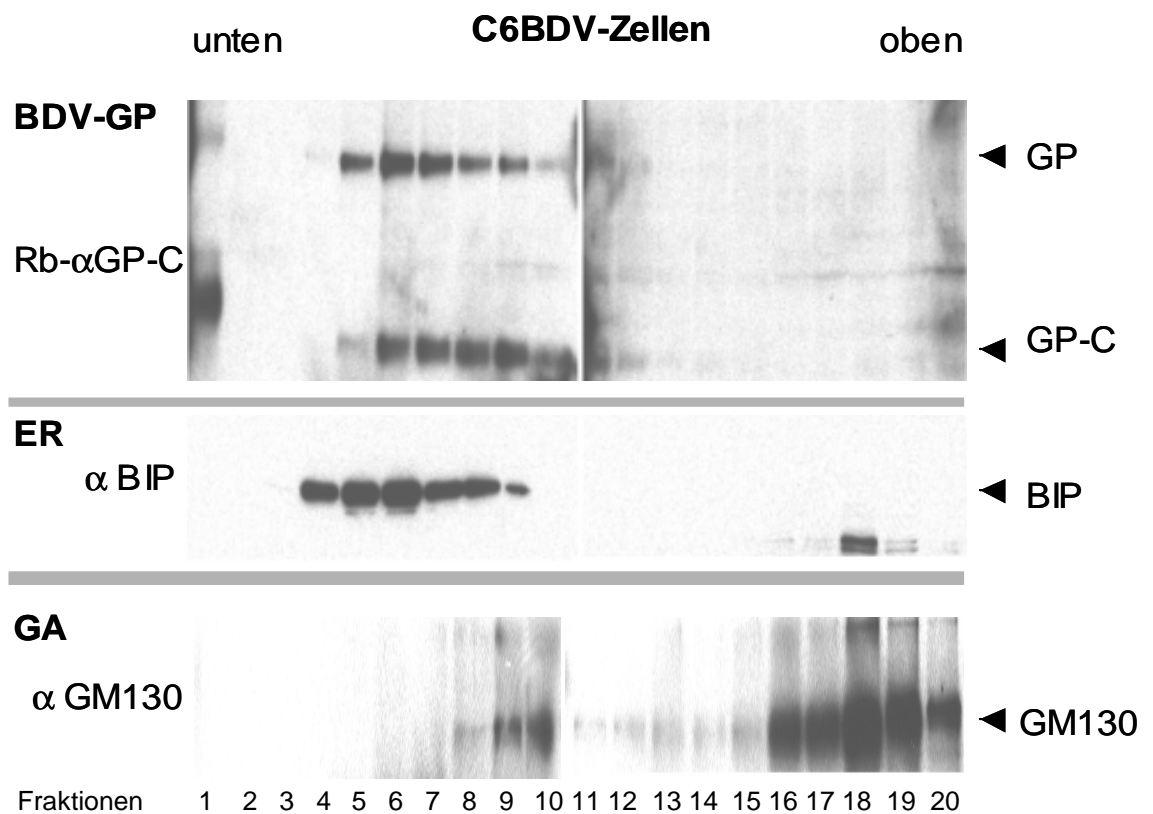


Abbildung 11: Zellfraktionierung von permanent BDV-infizierten Zellen und intrazelluläre Lokalisation des BDV-Glykoproteins.

Konfluente, permanent BDV-infizierte C6 Zellen wurden homogenisiert, unlösliche Bestandteile abgetrennt, und mit dem Überstand ein kontinuierlicher OptiPrep-Gradient beladen. Durch Ultrazentrifugation reicherten sich die verschiedenen zellulären Membrankompartimente dominant in unterschiedlichen OptiPrep-Dichten an (6.2.5). Der Gradient wurde in 20 Fraktionen abgenommen, die Membranen pelletiert, die Proteine in einer 11 %igen SDS-PAGE aufgetrennt (6.3.4), auf Nitrozellulosemembran übertragen (6.3.5) und Kompartiment-spezifische Markerproteine und das BDV-Glykoprotein wurden im Westernblot nachgewiesen (6.3.6). BiP (78 kDa), das Markerprotein des endoplasmatischen Retikulums (ER), GM130, das Golgi-Markerprotein 130 kDa (GA), GP (94 kDa), das ungespaltene Vorläufermolekül und GP-C (43 kDa), das C-terminale Spaltprodukt werden mit Pfeilspitzen markiert. Die molekulare Masse wurde näherungsweise mit dem „Rainbowmarker“ (5.1) bestimmt. Zu Gunsten der Übersicht wurde auf seine Darstellung in dieser Abbildung verzichtet.

7.3 Funktionelle Untersuchung verschiedener Domänen des BDV-Glykoproteins im CD8-Reportersystem

Die Beobachtung, dass das BDV Glykoprotein im endoplasmatischen Retikulum akkumuliert und nur in geringen Quantitäten weitertransportiert wird (7.2), warf die Frage auf, ob es bestimmte Signale im BDV-GP gibt, die für den verzögerten Transport verantwortlich sind.

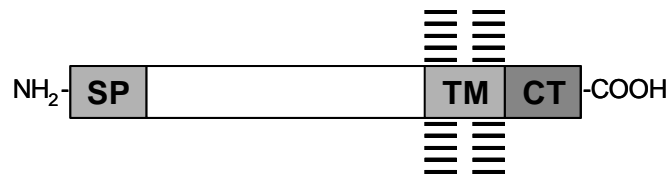


Abbildung 12: Überblick zum Membranprotein des Typ I. In grauen Abstufungen sind das Signalpeptid (SP), die Transmembrandomäne (TM) und die zytoplasmatische Domäne (CT) hinterlegt, die gestreiften Flächen symbolisieren die zelluläre Membran. Amino- und carboxyterminale Orientierung ist angezeigt.

Ein Membranprotein des Typ I besitzt folgende Domänen (Abbildung 12): das Signalpeptid (SP), die Transmembrandomäne (TM) und die zytoplasmatische Domäne (CT). Bekannte Aminosäuremotive in der zytoplasmatischen Domäne, die eine Retardierung oder Retention vermitteln und das Protein im endoplasmatischen Retikulum halten sind im BDV-GP nicht vorhanden. Der Einfluss von Signalpeptid, Transmembrandomäne und zytoplasmatischer Domäne des BDV-GP auf den intrazellulären Transport wurden im CD8-Reportersystem untersucht. CD8 ist ein Zelloberflächenprotein von zytotoxischen T-Zellen. Es ist ein klassisches Typ I Membranprotein und bildet entweder ein Homodimer aus zwei Alpha-Untereinheiten oder ein Heterodimer aus einer Alpha- und einer Beta-Untereinheit. Die CD8 α Untereinheit wurde als Reporterprotein ausgewählt, weil sie sehr effizient an die Zelloberfläche transportiert wird (Pascale *et al.*, 1992). Verschiedene Domänen des CD8 α wurden durch die entsprechenden Proteinanteile des BDV-GP ersetzt. Neben diesen CD8 α -BDV-GP-Chimären lag die CD8-E3/K19 Chimäre als Kontrollkonstrukt vor. Sie besitzt in ihrem zytoplasmatischen Anteil sechs Aminosäuren des adenoviralen Proteins E3/K19, die eine vollständige

Retention im endoplasmatischen Retikulum vermitteln (Pääbo *et al.*, 1987).

7.3.1 Der mögliche Einfluss des Signalpeptids auf den intrazellulären Transport

Das Signalpeptid ist eine hydrophobe Aminosäuresequenz, die während der Translation in die Membran des endoplasmatischen Retikulums inseriert wird und damit die kotranslationale Translokation des naszierenden Proteins in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums vermittelt (Martoglio und Dobberstein, 1998). Die ersten zwanzig N-terminalen Aminosäuren des BDV-GP sind nach Analysen der Aminosäuresequenz mit dem Vorhersageprogramm SignalP V1.1 Software (World Wide Web Prediction Server; Nielsen *et al.*, 1997) die Signalpeptidsequenz. Sie besitzt zudem ein „Spaltmotiv“ für ER-Signalasen. Mittels rekombinanter PCR-Technik (6.1.4) wurde das Signalpeptid des CD8 α durch das Signalpeptid des BDV-GP ersetzt (Abbildung 13A). Die Chimäre CD8-BDV-SP und CD8 α wurden auf Unterschiede in der intrazellulären Lokalisation verglichen. Dazu wurden Cos-7 Zellen mit den Konstrukten transfiziert (6.2.3) und entweder fixiert, das heißt mit permeabilisierter Plasmamembran (Abbildung 13B, a bis d), oder unfixiert, das heißt mit intakter Plasmamembran (Abbildung 13B, e bis h), mit einem CD8-spezifischen Antikörper in der indirekten Immunfluoreszenz (6.3.9) untersucht. Als Kontrollen wurden die Zellkerne mit DAPI oder das Plasmamembran-ständige Gangliosid GM1 mit Cholera Toxin B (Vyas *et al.*, 2001) parallel zu der CD8-Detektion gefärbt. Sowohl das CD8 α , als auch das chimäre Protein mit der Signalpeptidsequenz des BDV-GP wurden sehr effizient an die Zelloberfläche transportiert. Dies wurde insbesondere durch die Oberflächenfärbung von unfixierten Zellen deutlich (Abbildung 13B, e und h). Damit ist das Signalpeptid nicht für einen verzögerten Transport des BDV-Glykoproteins und seine Akkumulation im endoplasmatischen Retikulum verantwortlich.

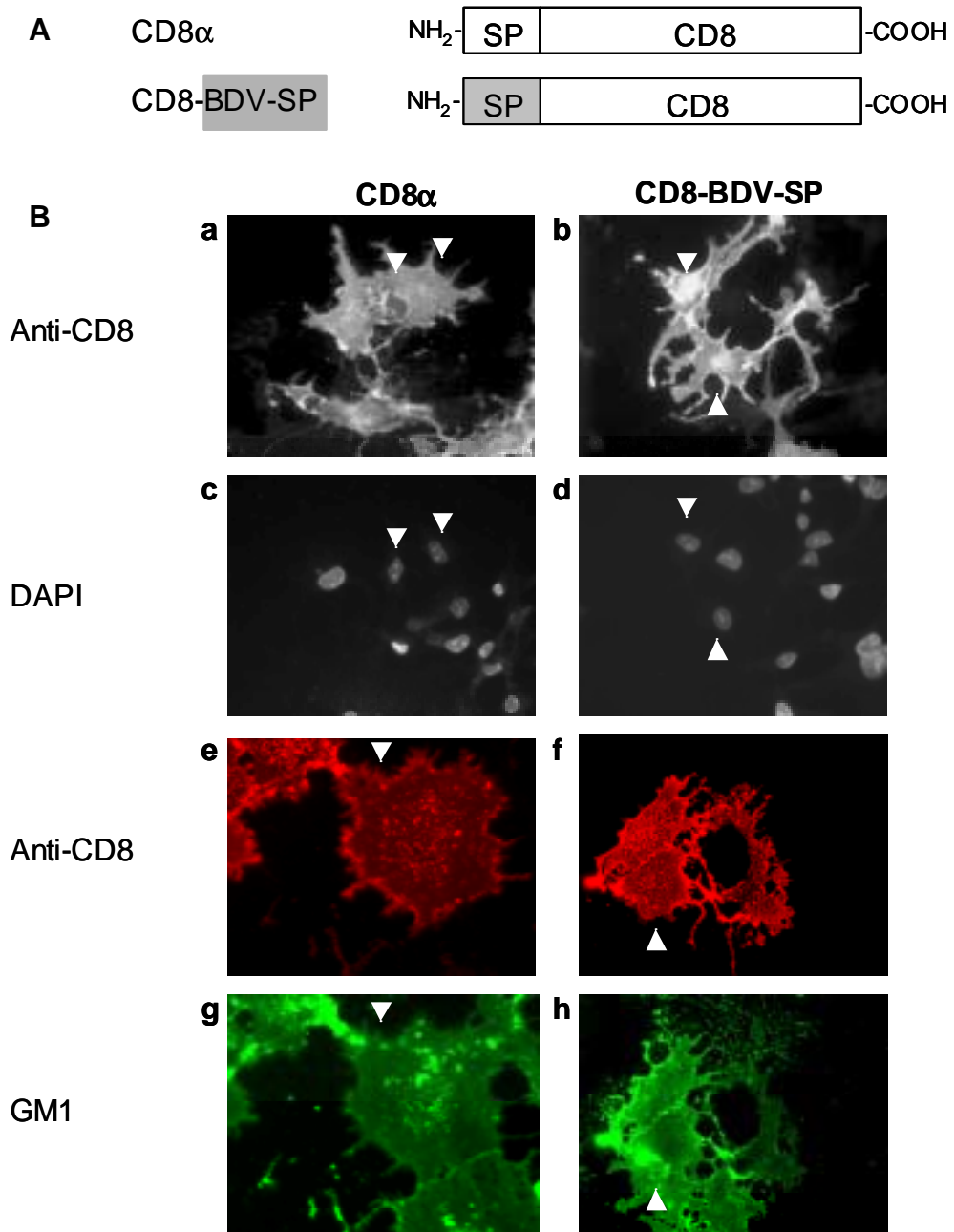


Abbildung 13: Subzellulären Verteilung der Proteine CD8 α und CD8-BDV-SP.

13A: Schematische Darstellung der Konstrukte CD8 α und CD8-BDV-SP. Leere Flächen sind CD8 α spezifische, graue Fläche BDV-GP spezifische Proteinsegmente. SP, Signalpeptidsequenz. **13B:** Indirekten Immunfluoreszenz. Subkonfluente Cos-7 Zellen wurden mit den in 13A dargestellten Konstrukten transfiziert (6.2.3). Die indirekte Immunfluoreszenz (6.3.9) erfolgte mit dem CD8-spezifischen mab Okt8 Antikörper (**a** bis **h**). Die Zellkerne von permeabilisierten, fixierten Zellen wurden zur Kontrolle parallel mit DAPI gegengefärbt (**b** und **f**). Unfixierte, intakte Zellen wurden zur Kontrolle der Expression an der Zelloberfläche gegen GM1 (**d** und **h**) bei 4 °C gefärbt. Die weißen Pfeilspitzen deuten auf Konstrukt-exprimierende Zellen und deren Kontrollfärbung. Die Zellen sind in 400-facher Vergrößerung dargestellt.

7.3.2 Einfluss der Transmembrandomäne und der zytoplasmatischen Domäne auf den intrazellulären Transport

Entsprechend der Untersuchung des BDV-Signalpeptids wurden die C-terminal gelegenen Domänen des BDV-Glykoproteins im CD8-Reportersystem untersucht. Neben definierten Signalen in der Aminosäuresequenz der zytoplasmatischen Domäne, kann die Transmembrandomäne auch durch ihre Länge oder andere Eigenschaften wie Ladung und Hydrophobizität über Interaktionen mit Anteilen der zellulären Membranen den Transport eines Proteins beeinflussen (Jackson *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1997). Die zytoplasmatische Domäne (CT) oder die Transmembrandomäne (TM) gemeinsam mit der zytoplasmatischen Domäne des CD8 α wurden durch die entsprechenden Proteindomänen des BDV-Glykoproteins ersetzt (Abbildung 14). Die daraus resultierenden Chimären CD8-BDV-CT und CD8-BDV-TM/CT wurden in der indirekten Immunfluoreszenz auf ihre intrazelluläre Lokalisation untersucht und mit der von CD8 α oder der CD8-Chimäre CD8-E3/K19 verglichen.

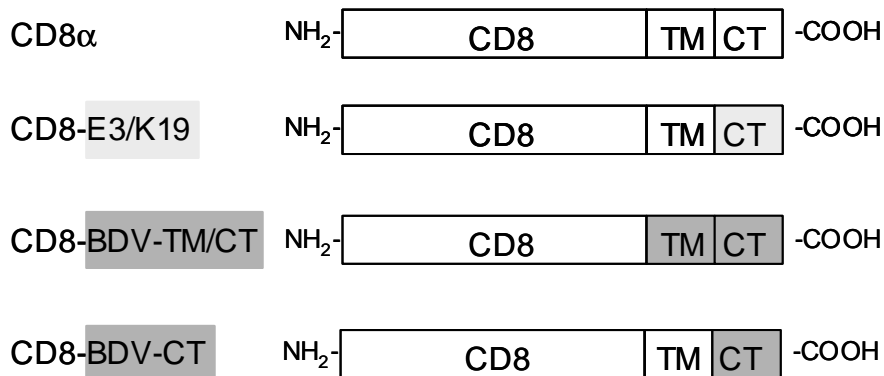


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Proteine CD8 α , CD8-E3/K19, CD8-BDV-TM/CT, und CD8-BDV-CT. Leere Flächen entsprechen CD8 α -spezifischen Proteinanteilen, hellgrau ausgefüllt ist die adenovirale zytoplasmatische Domäne mit dem ER-Retentionsignal, dunkelgraue Flächen sind BDV-GP-spezifische Proteindomänen. CT, die zytoplasmatische Domäne; TM, die Transmembrandomäne; Amino- und carboxyterminale Orientierung ist angezeigt.

Cos-7 Zellen wurden mit den Konstrukten transfiziert (6.2.3), fixiert und mit einem CD8-spezifischen Antikörper in der indirekten Immunfluoreszenz

(6.3.9) untersucht. Das CD8 α -Molekül diene als Kontrolle für einen effizienten Oberflächentransport und die Chimäre CD8-E3/K19 wurde als Vergleichskonstrukt für eine induzierte CD8-Retention im endoplasmatischen Retikulum verwendet. Zur Kontrolle wurden die Zellkerne mit DAPI gegen gefärbt (Abbildung 15A; b, d, f und h). Für die Darstellung der Oberflächenexpression wurden Zellen mit intakter Plasmamembran für eine Kofluoreszenzfärbung verwendet. Dabei wurde neben dem CD8 auch das GM1 der Plasmamembran nachgewiesen (Abbildung 15B, b, d, f und h).

CD8 α zeigt die typische dominante Lokalisation an der Zelloberfläche (Abbildung 15A, a; 15B, a). Das chimäre Molekül mit der zytoplasmatischen Domäne des adenoviralen Proteins E3/K19 verbleibt in dem netzartig die Zelle durchspannenden, endoplasmatischen Retikulum und gelangt nicht an die Zelloberfläche (Abbildung 15A, c; 15B, c). Das chimäre CD8-Molekül mit der Transmembrandomäne und der zytoplasmatischen Domäne des BDV-GP, CD8-BDV-TM/CT zeigt sich subzellulär in den Kompartimenten des kernnahen endoplasmatischen Retikulums. Die halbseitig verstärkte Fluoreszenz am Kern ist typisch für Kompartimente des Golgi-Apparats (Abbildung 15A, e). Es ist jedoch kein Signal an der Oberfläche der transfizierten Zellen zu sehen (Abbildung 15B, e). Das chimäre CD8-Molekül, bei dem nur die zytoplasmatische Domäne des BDV-GP ausgetauscht wurde, CD8-BDV-CT, verhält sich intrazellulär entsprechend dem CD8-BDV-TM/CT. Auch hier lässt sich die klassische Fluoreszenz im endoplasmatischen Retikulum und in Golgi-Kompartimenten zeigen (Abbildung 15A, g). Allerdings sind auch an der Zelloberfläche Anteile des Moleküls zu vermuten. Im Vergleich mit dem Gangliosid GM1 (Abbildung 15B, b, d, f und h) der Plasmamembran wird der Unterschied im Zelloberflächentransport sehr deutlich. Nur das chimäre CD8-Konstrukt mit der zytoplasmatischen Domäne des BDV-GP (Abbildung 15B, g) ist in der Lage die Zelloberfläche zu erreichen. Das CD8-BDV-TM/CT (Abbildung 15B, e) wird ebenso wie das Vergleichskonstrukt CD8-E3/K19 (Abbildung 15B, c) nicht an die Zelloberfläche transportiert.

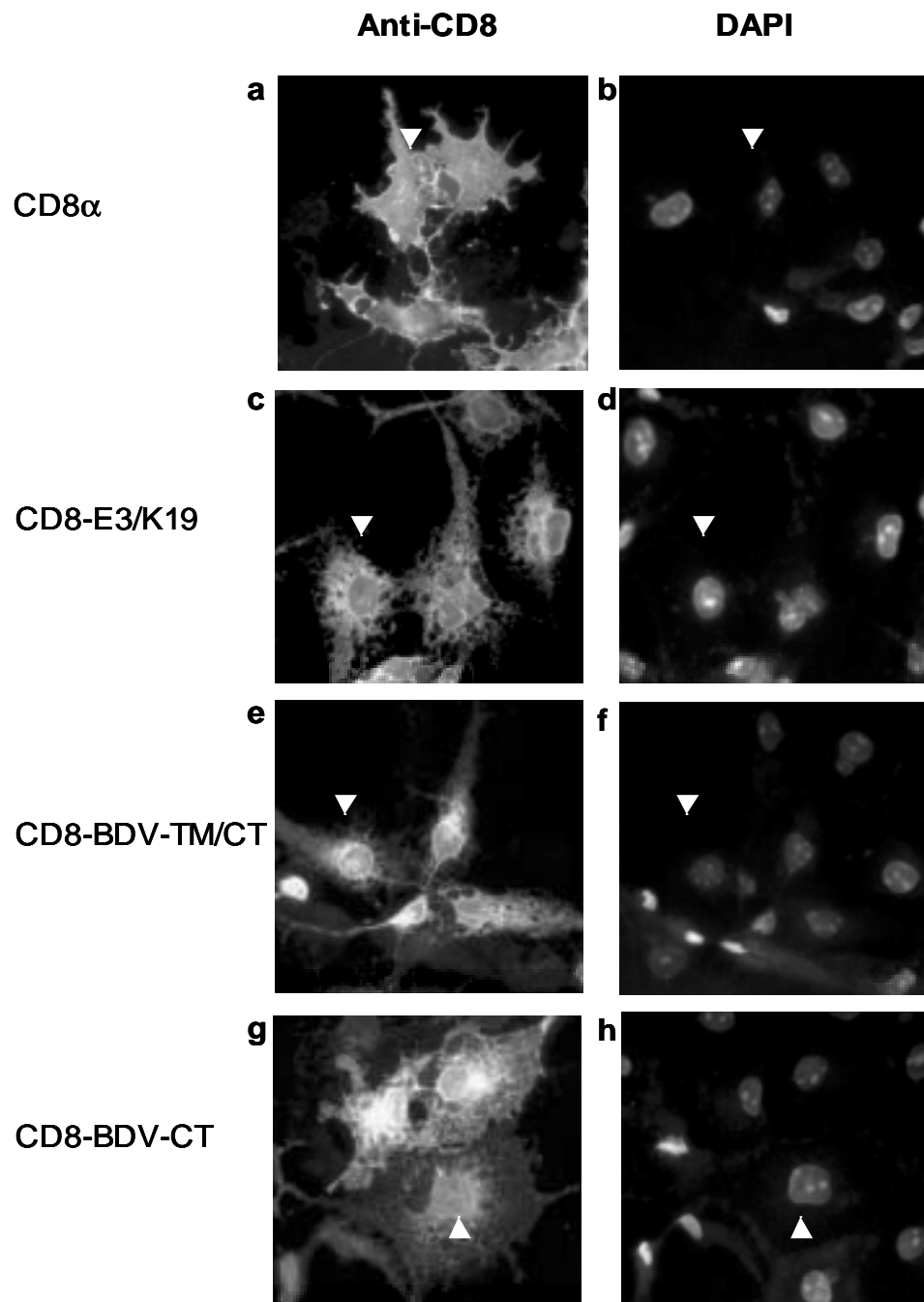


Abbildung 15A: Subzelluläre Verteilung der Proteine CD8 α , CD8-E3/K19, CD8-BDV-TM/CT und CD8-BDV-CT in der indirekten Immunfluoreszenz. Subkonfluente Cos-7 Zellen wurden nach Transfektion (6.2.3) mit den Konstrukten (Abbildung 14) fixiert. Die indirekte Immunfluoreszenz (6.3.9) erfolgte mit dem CD8-spezifischen mab Okt8 Antikörper (a bis h) und parallel als Kontrolle mit einer DAPI-Färbung (6.3.9) der Zellkerne (b, d, f und h). Die weißen Pfeilspitzen markieren exprimierende Zellen. Die Zellen sind in 400-facher Vergrößerung dargestellt.

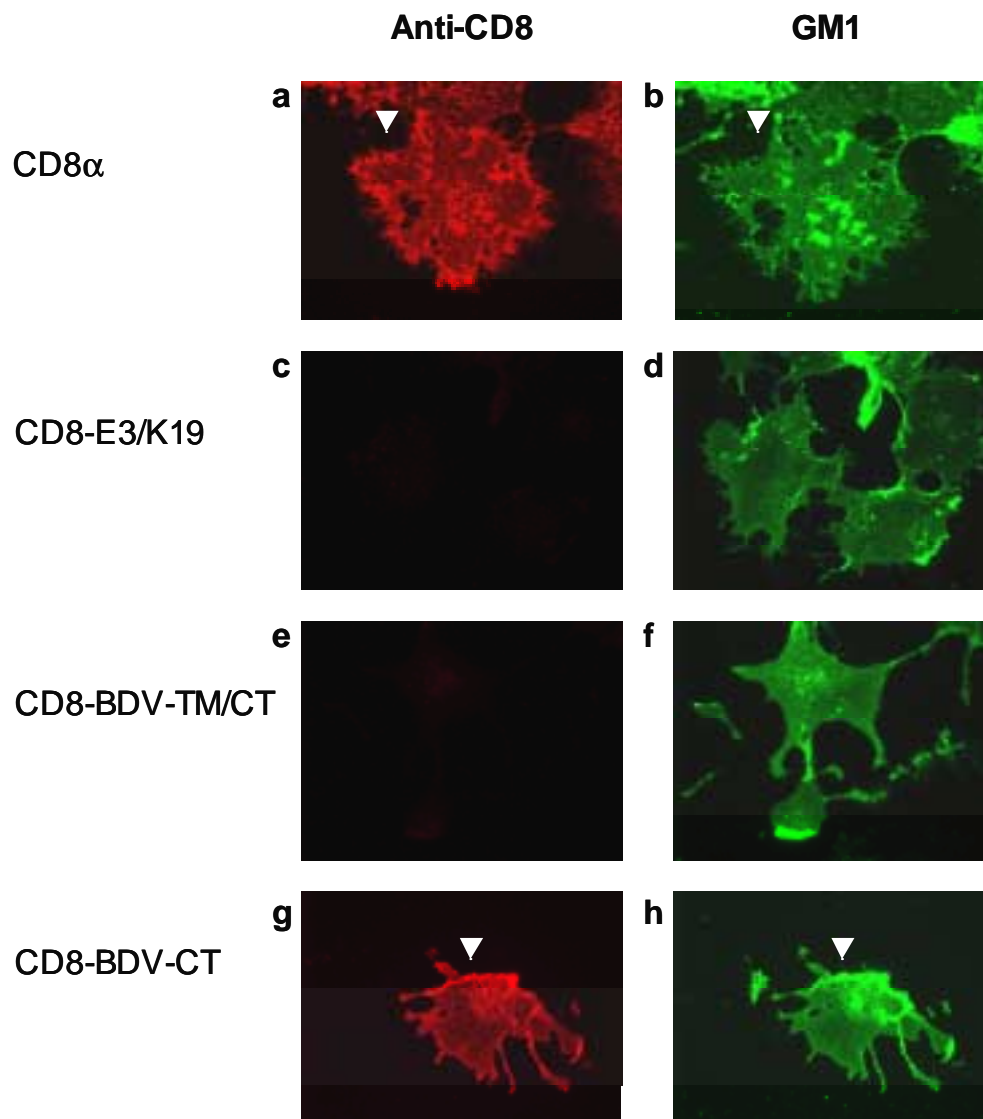


Abbildung 15B: Expression der CD8-Konstrukte an der Zelloberfläche. Subkonfluente Cos-7 Zellen wurden mit den Konstrukten CD8 α , CD8-E3/K19, CD8-BDV-TM/CT und CD8-BDV-CT (Abbildung 14) transfiziert (6.2.3). Der Nachweis erfolgte in der indirekten Immunfluoreszenz (6.3.9) mit dem CD8-spezifischen mab Okt8 (**a** bis **h**) an unpermeabilisierten, d.h. intakten Zellen bei 4°C. Zur Kontrolle der Expression an der Zelloberfläche wurde das GM1 der Plasmamembran (**b**, **d**, **f**, **h**) gefärbt. Die weißen Pfeilspitzen deuten auf Zellen und deren Kontrollfärbung. Die Zellen sind in 400-facher Vergrößerung dargestellt.

Um das Ergebnis der indirekten Immunfluoreszenz zu überprüfen, wurde der Transport der Konstrukte an die Zelloberfläche mittels Biotinylierung der dort lokalisierten Proteine untersucht. Parallel wurde die Gesamtheit der Zellproteine metabolisch markiert, um die Expression der CD8-Konstrukte zu standardisieren. Cos-7 Zellen wurden subkonfluent kultiviert und mit den Konstrukten (Abbildung 14) transfiziert (6.2.3).

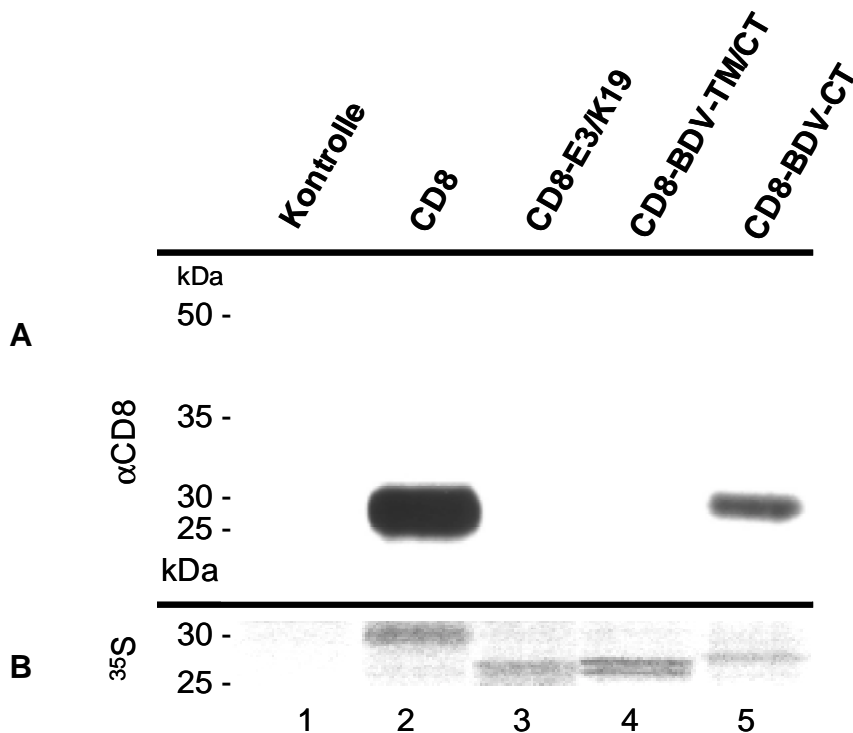


Abbildung 16: Autoradiographie und Zelloberflächenlokalisierung der CD8-Chimären CD8-BDV-TM/CT und CD8-BDV-CT. Subkonfluentes Cos-7 Zellen wurden mit den Konstrukten CD8 α (Spur 2), CD8-E3/K19 (Spur 3), CD8-BDV-TM/CT (Spur 4) und CD8-BDV-CT (Spur 5) transfiziert (6.2.3). Als Kontrolle dienten Cos-7 Zellen (Spur 1). Die Proteine wurden für drei Stunden mit Medium unter Zusatz von [35 S]-Methionin/Cystein markiert (6.2.8), die Zelloberflächenproteine wurden mit Sulfo-NHS-Biotin biotinyliert (6.2.4). Proteine lysierter Zellen wurden mit einem CD8-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert (6.3.1), in der SDS-PAGE aufgetrennt (6.3.4) und auf Nitrozellulosemembran (6.3.5) übertragen. 16A: Nachweis der biotinylierten Oberflächenproteine mit Streptavidin-Peroxidase (6.3.7). 16B: Autoradiographie der immobilisierten Proteine (6.3.8). Näherungsweise Bestimmung der molekularen Masse mit dem „Rainbowmarker“ (5.1).

Als Kontrolle wurde ein entsprechender Ansatz unbehandelter Cos-7 Zellen mitgeführt. Die Zellen wurden eine Stunde unter Cystein- und Methionin-freiem Kulturmedium inkubiert und anschließend die Proteine für drei Stunden unter Zusatz von [³⁵S]-Methionin/Cystein markiert (6.2.8). Die Amine der Zelloberflächenproteine wurden daraufhin mit Sulfo-NHS-Biotin markiert (6.2.4). Die Zellen wurden lysiert und die Proteine mit einem CD8 spezifischen Antikörper immunpräzipitiert (6.3.1), in der SDS-PAGE aufgetrennt (6.3.4) und auf Nitrozellulosemembran (6.3.5) übertragen. Die so immobilisierten Proteine wurden zunächst autoradiographisch analysiert (6.3.8) und daraufhin die biotinylierten Proteinanteile mit Streptavidin-Peroxidase in der Chemoluminiszenz nachgewiesen (6.3.7). Das CD8 α und die Chimäre CD8-BDV-CT gelangen an die Zelloberfläche (Abbildung 16A, Spuren 2 und 5) und sind damit zugänglich für eine Biotinylierung. Die Chimären CD8-E3/K19 und CD8-BDV-TM/CT werden nicht an die Zelloberfläche transportiert (Abbildung 16A, Spuren 3 und 4). Damit wurden die Untersuchungen in der indirekten Immunfluoreszenz bestätigt (Abbildungen 15A und 15B). Die Autoradiographie dieser CD8 Konstrukte in Abbildung 16B bestätigt, dass alle Expressionen erfolgreich waren. Die Laufunterschiede zwischen den chimären Konstrukten und dem originalen CD8 α sind durch die Fremdproteinanteile zu erklären. Eine verlässliche Aussage über die Quantitäten ist hier allerdings nur näherungsweise möglich. Dennoch lässt sich anhand dieser Ergebnisse eindeutig zeigen, dass die carboxyterminalen Domänen des BDV-GP eine intrazelluläre Akkumulation des CD8 α -Proteins induzieren können.

8 Diskussion

8.1 Die Identifizierung des N-terminalen Spaltprodukts GP-N des BDV-Glykoproteins

Die seit langem bestehende Frage nach dem Verbleib des N-terminalen Spaltprodukts GP-N des BDV-Glykoproteins GP konnte in dieser Arbeit erstmals beantwortet werden. Das Spaltprodukt GP-N wurde in seiner glykosylierten Form in permanent BDV-infizierten Zellen nachgewiesen (7.1.1). Das war bis dato nicht gelungen. Es ist davon ausgegangen worden, dass das N-terminale Spaltprodukt *in vivo*, kurz nach der Spaltung des GP-Vorläufers, in der Zelle degradiert wird (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1997). Das BDV-Glykoprotein ist das einzige integrale Membranprotein des BDV-Partikels. Es ist damit für den initialen Kontakt mit einer Wirtszelle, für die Virusinvasion und damit für die Infektiosität des Virus von besonderer Bedeutung (Schneider *et al.*, 1997a; Gonzalez-Dunia *et al.*, 1997; Richt *et al.*, 1998; Perez *et al.*, 2001). Es wurden bisher nur zwei Glykoproteinformen als Produkte des vierten offenen Leserahmens beschrieben: das ungespaltene GP (gp84/gp94) und das C-terminale Spaltprodukt GP-C (gp43). Die Funktion der Rezeptorbindung wurde dem ungespaltenen GP zugeschrieben, wohingegen das GP-C für die pH-abhängige Fusion der Virushülle mit der zellulären Membran verantwortlich ist (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1998; Perez *et al.*, 2001). BDV-neutralisierende Antikörper zeigten sich reaktiv gegenüber dem Glykoprotein und seiner Glykane und konnten die Infektiosität von BDV reduzieren oder präventiv wirken (Schneider *et al.*, 1997a; Stoyloff *et al.*, 1998; Furrer *et al.*, 2001). Das N-terminale Spaltprodukt GP-N wurde lediglich durch Nachspaltung von *in vitro* translatiertem und unglykosyliertem p57 mit löslichem Furin als p27 nachweisbar generiert (Richt *et al.*, 1998). Als 51 kDa Protein ließ es sich nach vektorgestützter Einzelexpression in Säugerzellen und deren Behandlung mit löslichem Furin darstellen (Lenz, 1998). Die Schwierigkeit des Nachweises von GP-N beruhte einerseits auf das Fehlen eines geeigneten Antikörpers gegen

GP-N, andererseits war davon auszugehen, dass es nur in sehr geringen Mengen vorlag. Da BDV eine persistierende Infektion verursacht, werden virale Proteine nur moderat exprimiert. Im Gegensatz dazu stehen akuten Infektionen, beispielsweise durch das Influenzavirus verursacht, die zu einem sogenannten „host cell shutdown“ durch die Überexpression der eigenen viralen Proteine führt. Erst eine Kombination aus Anreicherung des hochglykosylierten GP-N mit spezifischen Lektinen und anschließender Freilegung der antigenen Aminosäuresequenz im GP-N erlaubte den spezifische Nachweis mit dem N-Terminus spezifischen Anti-Peptidserum Rb- α GP-N. Um dieses Protein in seiner glykosylierten Form darstellen zu können, musste also die Maskierung der immobilisierten Proteine durch die umgebenden mannosereichen N-Glykane mit Hilfe einer Endoglykosidase H Behandlung entfernt werden. Diese sogenannte „Kohlehydratmaskierung“ (carbohydrate masking) von antigenen Epitopen tritt bei Influenzaviren natürlicherweise auf und verhindert mit dem Mechanismus des „antigenic drift“ den Angriff des Immunsystems (Seidel *et al.*, 1991; Munk *et al.*, 1992). Das GP-N stellt sich, aufgrund seiner erhöhten Glykosylierung, als eine Bande mit diffusem Laufverhalten und einer daher nicht genau definierbaren molekularen Masse in der SDS-PAGE dar. Dies steht im Widerspruch zu dem in vitro generiertem N-terminalen Spaltprodukt mit einer molekularen Masse von 51 kDa (Lenz, 1998). Interessant war in den vorliegenden Experimenten, dass das ungespaltene GP von dem Anti-Peptidserum Rb- α GP-N ohne Deglykosylierung im Westernblot detektiert werden konnte (7.1.1). Für den reifenden Glykoproteinvorläufer des Semliki Forest Virus wurde gezeigt, dass eine Veränderungen der Zusammensetzung seiner N-Glykane durch Inhibitoren auch seine antigenen Eigenschaften veränderte (Kaluza *et al.*, 1990). Dies war ein erster Hinweis auf eine unterschiedliche Glykosylierung von GP und seinen Spaltprodukten.

Da jetzt der Nachweis von GP-N möglich war, konnte nun auch die Frage, ob GP-N Bestandteil der viralen Hüllmembran ist, geklärt werden. Bisher konnte nur GP-C dargestellt werden. Die vorliegenden Untersuchungen einer virusangereicherten Präparation (7.1.2) zeigen, dass GP-N ebenfalls

ein Bestandteil des BDV-Partikels ist. Anders als in früheren Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, konnte das ungespaltene GP in einer Viruspräparation unter reduzierenden Bedingungen nicht nachgewiesen werden (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1997). Das Vorhandensein von GP-N im Virus steht im Einklang mit dem Befund, dass die neutralisierenden Epitope von BDV-Antikörpern und damit auch die Rezeptorbindungsstelle des Virus, im N-terminalen Bereich des Glykoproteins liegen. Dazu wurden GP-N Anteile des BDV-GP an die carboxyterminalen Domänen des G-Proteins des Vesikular Stomatitis Virus (VSV) fusioniert. Diese Chimären wurden zur Herstellung von rekombinantem VSV verwendet, die für Infektionsexperimente eingesetzt wurden. Eine Behandlung dieser rekombinanten Viren mit neutralisierenden Antisera führte zur Verringerung der Infektiosität dieses Virus (Perez *et al.*, 2001). Zudem konnte gezeigt werden, dass GP-C und GP-N selektiv in die virale Hüllmembran eingebaut werden. Dass die Spaltung eines viralen Glykoproteins Voraussetzung für dessen Einbau in virale Partikel ist, wurde schon für das Lassavirus Glykoprotein gezeigt, wobei der Einbau des proteolytisch aktivierten Glykoproteins nicht notwendig für die eigentliche Virusmorphogenese war (Lenz *et al.*, 2001). GP-N wird in der infizierten Zelle generiert und ist Bestandteil des Viruspartikels. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Art der Interaktion von GP-C und GP-N zu analysieren. Hierfür können unter anderem hydrophobe Wechselwirkungen verantwortlich sein, wie dies für andere aktivierte, fusionskompetente virale Glykoproteine beschrieben ist, beispielsweise für den Trimerenkomplex von gp41/gp120 des HIV (Sanders *et al.*, 2002).

8.2 Die Glykosylierung des BDV-GP und seiner Spaltprodukte GP-C und GP-N in permanent BDV-infizierten Zellen

Das GP-Vorläufermolekül und die Spaltprodukte GP-C und GP-N unterscheiden sich in den N-glykosidisch gebundenen Glykanen. Dies wurde durch die Behandlung von Lektin-präzipitierten BDV-Glykoproteinen

mit Endoglykosidasen deutlich (7.2). Das ungespaltene GP ist mannosereich glykosyliert, da sowohl die Behandlung mit Endoglykosidase H, die alle mannosereichen Glykane abspaltet, als auch mit Peptid-N-Glykosidase F, dieses Enzym spaltet alle N-glykosidisch gebundenen Zucker ab, eine Verringerung der molekularen Masse auf 57 kDa zur Folge hat. Dies entspricht dem unglykosylierte p57. Anders verhalten sich GP-C und GP-N. Beide Spaltprodukte werden nach Endoglykosidase H Behandlung nur unvollständig deglykosyliert. Das beweist, dass Anteile der Zuckerseitenketten von GP-C und GP-N Glykane vom komplexen Typ enthalten. Das GP wird nur in sehr geringen Anteilen in permanent BDV-infizierten Zellen gespalten (Kiermayer, 1999). Die Tatsache das ungespaltenes GP anders glykosyliert ist als seine Spaltprodukte, legt für den spaltbaren GP-Anteil einen abweichenden intrazellulären Transport und/oder eine weiterführende Prozessierung nahe. Die Modifikation durch komplexere Glykane findet erst in späteren Abschnitten des sekretorischen Transportwegs statt. Ebenso stellte sich nach den vorliegenden Ergebnisse die Frage, ob nicht ein Teil des GP erst durch ein verändertes Glykosylierungsmuster für die aktivierende Protease zugänglich wird. Entsprechendes wurde für die Spaltungsrate des gp62 des Semliki Forest Virus beschrieben. Die Entstehung der Spaltprodukte E1 und E2 war deutlich reduziert, wenn die Art der N-Glykane durch Trimming Inhibitoren verändert wurde. Interessant ist zudem, dass in Folge die Virusfreisetzung nur eingeschränkt stattfand (Kaluza *et al.*, 1990). Die PNGase F Behandlung der Spaltprodukte resultiert in vollständig deglykosyliertem GP-C (30 kDa) und einer distinkten Bande von vollständig deglykosyliertem GP-N mit einer molekularen Masse von 27 kDa (7.1.1 und 7.1.2). Dieser Befund deckt sich mit den Spaltungsversuchen an in vitro translatiertem p57 (Richt *et al.*, 1998). Die Art und Zusammensetzung der Glykosylierung eines Proteins kann Einfluss nehmen auf den intrazellulären Transport, die Fusionsaktivität und die Rezeptorbindung, sowie seine proteolytische Aktivierung. Dies wurde für das Hämagglutinin des Influenza A Virus gezeigt (Ohuchi *et al.*, 1989). Ebenso werden die Faltung und

Oligomerisierung von Glykoproteinen durch ihre Glykane beeinflusst. So wurde experimentell gezeigt, dass der Einsatz von Glukosidaseinhibitoren, und eine infolgedessen veränderte N-Glykanausstattung der Influenza A Virus Glykoproteine Hämagglutinin und Neuraminidase, einen direkten Einfluss auf ihren Transport an die Zelloberfläche haben (Seito und Yamaguchi, 2000). Glukosidaseinhibitoren haben einen antiviralen Effekt, der auch für den klinischen Einsatz bei Infektionen mit dem humanen Immundefizienz Virus diskutiert wird (Walker *et al.*, 1987). Das Virus der Bornaschen Krankheit könnte mit Hilfe der zellulären, uneffizienten Prozessierung seines Glykoproteins Einfluss nehmen auf die Bereitstellung von viralem, gespaltenen Hüllprotein an der Zelloberfläche und damit auch auf die Virusfreisetzung, die im Falle des BDV nur sehr gering ist (Carbone *et al.*, 1993).

8.3 Die subzelluläre Lokalisation des BDV-Glykoproteins und Identifizierung des Kompartiments der Spaltung

Das BDV-GP wird im endoplasmatischen Retikulum oder einem intermediären Kompartiment gespalten. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit mit der Fraktionierung von subzellulären Membrankompartimenten permanent BDV-infizierter Zellen gezeigt (7.2). Es war bekannt, dass GP-C an die Zelloberfläche gelangt, wohingegen das ungespaltene Glykoprotein GP im endoplasmatischen Retikulum retardiert oder retiniert wird (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1998). Dem gegenüber stehen Daten, dass nach Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen permanent BDV-infizierter Zellen beide membranverankerten BDV-Glykoproteine, GP und GP-C, auf der Zelloberfläche detektierbar sind (Kiermayer, 1999). In welchem Zellkompartiment die Spaltung stattfindet war unklar. Die Spaltungsexperimente mit löslichem Furin legten jedoch nahe, dass die Spaltung im späten Golgi-Kompartiment, dem trans-Golgi Netzwerk, stattfindet, da hier Furin, als BDV-GP aktivierende Protease, seine höchste Aktivität zeigt (Richt *et al.*, 1998; Vey *et al.*, 1994). Die Proproteinkonvertase Furin wurde für eine Vielzahl von viralen

Glykoproteinen als aktivierende Protease beschrieben (Klenk und Garten, 1994), wie beispielsweise dem Glykoprotein GP (GP1/GP2) des Ebolavirus (Volchkov *et al.*, 2000) oder dem HIV-Glykoprotein gp160 (gp41/gp120) (Hallenberger *et al.*, 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das BDV-GP vorwiegend im endoplasmatischen Retikulum nachweisbar ist. Die Akkumulation im endoplasmatischen Retikulum (ER) wurde schon in früheren Kolokalisationsstudien mit BiP, einem ER-Chaperon, in der Immunfluoreszenz gezeigt (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1997). Das BiP-Protein wurde auch in dem vorliegenden Untersuchungen (7.2) als ER-Markerprotein verwendet. Das C-terminale Spaltprodukt GP-C wird nach diesen Untersuchungen am Immunoblot im endoplasmatischen Retikulum generiert, wobei es im geringeren Maße auch im Golgi-Kompartiment nachweisbar ist. Dieses Ergebnis zeigt einen völlig neuen Aspekt in der Prozessierung des BDV-Glykoproteins auf. Anders als zu erwarten gewesen wäre, beginnt die GP-Spaltung schon im endoplasmatischen Retikulum oder einem ER-nahen intermediären Kompartiment. Das ubiquitäre Furin (Seidah *et al.*, 1994), als GP-aktivierende Protease, ist auch im frühen sekretorischen Transportweg schon nachweislich aktiv und so beispielsweise verantwortlich für die proteolytische Spaltung von mutiertem und falsch gefaltetem Insulin-Prorezeptor Pro⁶², der in Folge schnell von der Zelle abgebaut werden kann (Bass *et al.*, 2000). Die vorliegenden Ergebnisse stehen demnach nicht im Widerspruch zu den *in vitro* durchgeführten Experimenten (Richt *et al.*, 1998). Interessant ist, dass zwischen der ER-Akkumulation des GP und der Persistenz des BDV in den Wirtszellen ein Zusammenhang bestehen könnte. Für das humane Zytomegalievirus und für Adenoviren wurde z.B. folgender Mechanismus vorgeschlagen: durch die ER-Lokalisation von viralen Glykoproteinen wird die Oberflächenexpression von MHC-Klasse I Komplexen herunterreguliert (Pääbo *et al.*, 1987; Jones *et al.*, 1995). Dieses wäre eine Möglichkeit wie ein Virus indirekt Einfluss auf die Immunantwort seines Wirts nehmen könnte, da auf diese Weise die zytotoxische T-Zellantwort beeinflusst wird. Insbesondere für Foamy Viren wurde hier ein

Zusammenhang zwischen diesem Model und seiner Persistenz diskutiert (Göpfert *et al.*, 1997).

8.4 Der Einfluss unterschiedlicher Domänen des BDV-Glykoproteins auf den intrazellulären Transport – erste Untersuchungen im CD8-Reportersystem

Die carboxyterminalen Domänen des BDV-Glykoproteins, das heißt die Transmembrandomäne und die zytoplasmatische Domäne, nicht aber das aminoterminal Signalpeptid, beeinflussen den intrazellulären Transport von CD8 α -BDV-GP Chimären und führen zu deren intrazellulärer Akkumulation. Dabei stellte sich heraus, dass die zytoplasmatische Domäne des BDV-GP nicht hinreichend ist für eine vollständige Inhibition des Transports an die Plasmamembran. Der Zelloberflächentransport wurde im CD8-Reportersystem detaillierter untersucht. Es wurden Chimären aus CD8 α und BDV-GP Domänen hergestellt, um deren möglichen Einfluss auf den intrazellulären Transport zu klären. CD8 α wird sehr effizient und schnell an die Zelloberfläche transportiert und eignet sich daher als Vergleichsmolekül (Pascale *et al.*, 1992). Zunächst wurde die N-terminal gelegene Signalpeptidsequenz des BDV-GP an das CD8 α -Molekül fusioniert (7.3.1). Für das HIV-Glykoprotein ist beschrieben, dass eine ineffiziente Abspaltung des Signalpeptids zu einer Retardierung im endoplasmatischen Retikulum, einer Beeinträchtigung der Proteinfaltung und so zu einer Verzögerung der Spaltung und des Transports an die Zelloberfläche führt (Li *et al.*, 2000). Das BDV-Signalpeptid hatte jedoch keinen Einfluss auf den Transport dieser Chimäre. Sie war ausschließlich an der Zelloberfläche zu detektieren und zeigt keine intrazelluläre Verteilung. Damit stand im weiteren die Untersuchung der carboxyterminalen Domänen des GP im Vordergrund (7.3.2). So könnte die GP-Transmembrandomäne durch ihre Länge und ihre hydrophoben Eigenschaften die subzelluläre Lokalisation durch Interaktionen mit Bestandteilen der umgebenden Lipiddoppelmembran der Zellkompartimente determinieren (Yang *et al.*, 1997). Die nicht kovalent

verbundenen glykosylierten Hüllproteine E1/E2 des Hepatitis C Virus vermitteln beispielsweise ihre ER-Resistenz durch zwei Transmembrandomänen (TM). Protein E1 und E2 bringen dabei je eine TM-Domäne mit, die für sich allein schon ER-Retention vermittelt (Dubuisson *et al.*, 2002). Die vorliegenden Untersuchungen in der indirekten Immunfluoreszenz und nach Biotinylierung von exprimierten CD8-Konstrukten an der Zelloberfläche ergaben, dass der Austausch der Transmembrandomäne und der zytoplasmatischen Domäne des CD8 durch die entsprechenden Sequenzen des BDV-GP den Transport an die Zelloberfläche vollständig inhibiert. Stattdessen zeigte diese Chimäre eine vergleichbare subzelluläre Verteilung wie das Kontrollkonstrukt CD8-E3/K19, das über ein zytoplasmatisches Lysinmotiv im endoplasmatischen Retikulum retiniert wird. Ein ER-Retention vermittelndes Aminosäuremotiv für lösliche Proteine ist beispielsweise KDEL (Munro und Pelham, 1987). In der zytoplasmatischen Domäne von Typ I Membranproteinen sind ebenfalls definierte Aminosäuresignale vorhanden, die ER-Retention- bzw. Retardierung vermitteln. Ein Dilysinmotiv mit der Konsensussequenz K(X)KXX, wobei hier X für eine beliebige Aminosäure steht, wurde als solches beschrieben (Jackson *et al.*, 1990). In der zytoplasmatischen Domäne des BDV-GP mit der Aminosäuresequenz: „...FARRRRLGRWQE-COOH“ konnte kein bekanntes Signal identifiziert werden. Wird nur die zytoplasmatische Domäne des CD8 α durch die des BDV-GP ersetzt zeigt sich dennoch eine deutlich veränderte subzelluläre Lokalisation verglichen mit CD8 α oder CD8-BDV-TM/CT. Neben den intrazellulären Signalen wird dieses Molekül auch sehr effizient an die Zelloberfläche transportiert. Im CD8-Reportersystem sind deutlich die Einflüsse von BDV-GP Domänen dokumentierbar, wobei nicht auszuschließen ist, dass eine Konformationsstörung oder die Inhibition von Proteinfaltungsvorgängen durch die Fremdproteinanteile für eine ER-Chaperon vermittelte Akkumulation im endoplasmatischen Retikulum verantwortlich ist. Die Untersuchungen im CD8-Reportersystem bezüglich der C-terminal gelegenen BDV-GP Domänen (TM und CT) unterstützen jedoch Ergebnissen aus der Zellfraktionierung und damit die Akkumulation

von GP in permanent BDV-infizierten Zellen (8.3). Die Untersuchung des Einflusses der BDV-GP Transmembrandomäne ohne zytoplasmatische Domäne auf den CD8 α Transport steht noch aus. Sie ist notwendig, um eine grundsätzliche Aussage zu der Akkumulation von GP bezüglich seiner Domänen machen zu können. Mit den vorliegenden Untersuchungen ist nicht auszuschließen, dass allein die Transmembrandomäne des BDV-Glykoproteins für eine vollständige, intrazelluläre Akkumulation hinreichend ist. Allerdings konnte in Untersuchungen des Strukturproteins E1 des Rötelvirus im CD8-Reportersystem gezeigt werden, dass E1 für seine ER-Retention beide Domänen (TM-CT) benötigt (Hobman *et al.*, 1997). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch deutlich, dass die zytoplasmatische Domäne des BDV-GP nicht allein für einen verzögerten Transport verantwortlich sein kann.

8.5 Resümee

In Abbildung 17 sind die bisher bekannten zellulären Abläufe einer BDV-Infektion zusammengefasst: Das Glykoprotein des Virus der Bornaschen Krankheit ist notwendig für den initialen Zellkontakt und die rezeptorvermittelte Endozytose des BDV (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1998; Perez *et al.*, 2001). Der GP-Vorläufer wird während der Virusreplikation kotranslational in das endoplasmatische Retikulum synthetisiert. Hier wird es N-glykosyliert und akkumuliert. Das endoplasmatische Retikulum ist das zelluläre Kompartiment in dem die proteolytische Aktivierung des GP-Vorläufers zu dem membranständigen GP-C und der Ektodomäne GP-N stattfindet (7.1 und 7.2). Die GP-Spaltung ist für die Infektiosität des BDV von entscheidender Bedeutung. Beide Spaltfragmente gelangen mit weiter modifizierten N-Glykanen an die Zelloberfläche (7.1.1), ebenso wie der ausschließlich mannosereich glykosylierte GP-Vorläufer (Kiermayer, 1999). Nur GP-C und GP-N werden selektiv in die Membranhülle entstehender BDV-Partikel eingelagert (7.1.2). Der Prozess der

Virusmorphogenese findet an der Zelloberfläche statt (Kohno *et al.*, 1999) und ist im Fall von BDV sehr ineffizient (Carbone *et al.*, 1993).

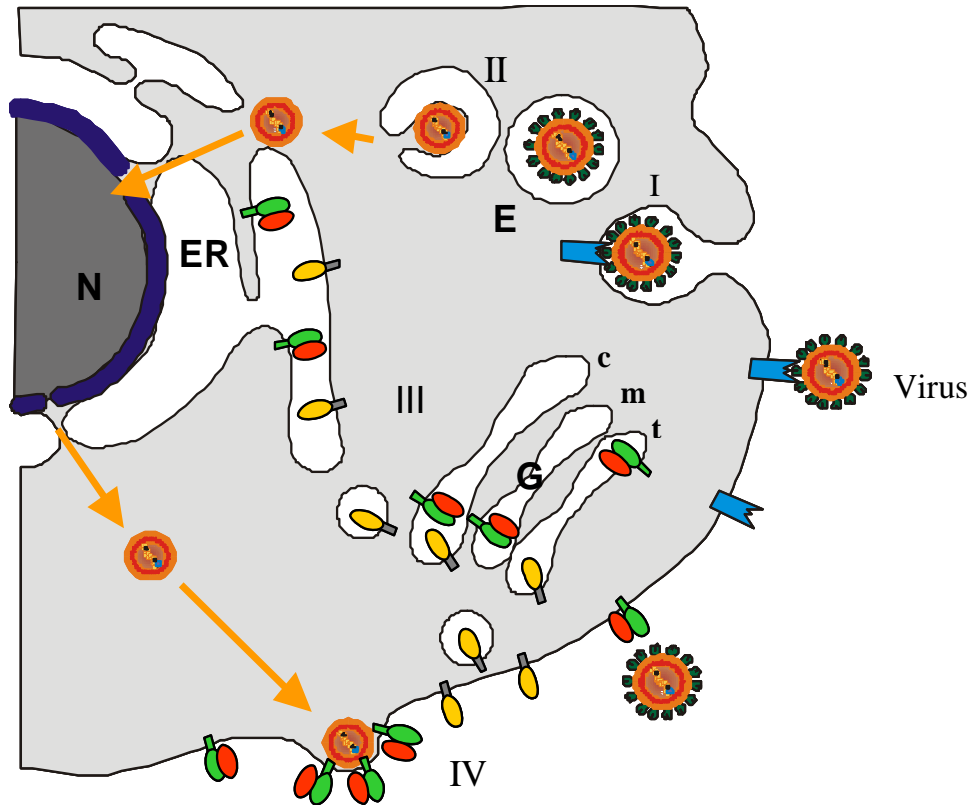


Abbildung 17: Schematischer Überblick zur Virusaufnahme und Virusmorphogenese in einer eukaryontischen Zelle. Dargestellt ist der Ausschnitt einer eukaryontischen Säugerzelle mit: Nukleus (N), endoplasmatischem Retikulum (ER), cis-median-trans (c-m-t) Golgi Kompartiment (G) und das Endosom (E). I) Rezeptorvermittelte Aufnahme des Virus in die Zelle. II) durch sauren, endosomalen pH kommt es zur Glykoprotein-vermittelten Fusion von endosomaler und viraler Membran und der Freisetzung des Ribonukleoproteinkomplexes und dessen Transport in den Nukleus, dem Ort der Genomtranskription und -replikation. III) Das Glykoprotein GP wird kotranslational in das ER synthetisiert, N-glykosyliert und, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, auch proteolytisch aktiviert. Modifikationen zu hybriden oder komplexen N-Glykanen finden auf dem weiteren sekretorischen Weg durch die Golgi-Kompartimente statt. IV) Ziel des intrazellulären Transports ist die Zelloberfläche, dem Ort der Virusmorphogenese. GP ist ungespalten (gelb) oder gespalten (grün, GP-C/rot-GP-N) dargestellt. Nur gespaltenes Glykoprotein ist in entstehenden Viren vorhanden.

9 Literaturverzeichnis

- Bass J., Turck C., Rouard M. und Steiner D.F. (2000).** Furin-mediated processing in the early secretory pathway: sequential cleavage and degradation of misfolded insulin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11905-9.
- Boyd W.C. (1962).** Introduction to Immunochemical Specificity. Wiley-Interscience, New York: 1-158.
- Briese T., de la Torre J.C., Lewis A., Ludwig H. & Lipkin W.I. (1992).** Borna disease virus, a negative-strand RNA virus, transcribes in the nucleus of infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 11486-9.
- Briese T., Schneemann A., Lewis A.J., Park Y.S., Kim S., Ludwig H. & Lipkin W.I. (1994).** Genomic organization of Borna disease virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 4362-6.
- Carbone K.M., Rubin S.A., Sierra-Honigmann A.M. und Lederman H.M. (1993).** Characterization of a glial cell line persistently infected with borna disease virus (BDV): influence of neurotrophic factors on BDV protein and RNA expression. *J Virol* **67**: 1453-60.
- Cubitt B. und de la Torre J.C. (1994).** Borna disease virus (BDV), a nonsegmented RNA virus, replicates in the nuclei of infected cells where infectious BDV ribonucleoproteins are present. *J Virol* **68**: 1371-81.
- Cubitt B., Oldstone C. und de la Torre J.C. (1994).** Sequence and genome organization of Borna disease virus. *J Virol* **68**: 1382-96.
- Danner K. und Mayr A. (1979).** In vitro studies on Borna virus II. Properties of the virus. *Arch Virol* **61**: 261-71.
- De la Torre J.C., Carbone K.M. und Lipkin W.I. (1990).** Molecular characterization of the Borna disease agent. *Virology* **179**: 853-6.
- De La Torre J.C. (2000a).** Bornavirus and the brain. *J Infect Dis* **186**: S241-7.
- De la Torre J.C. (2002).** Molecular biology of Borna disease virus and persistence. *Front Biosci* **1**: d569-79.
- Dubuisson J., Penin F. und Moradpour D. (2002).** Interaction of hepatitis C virus proteins with host cell membranes and lipids. *Trends Cell Biol* **12**: 517-23.
- Dürrwald R. und Ludwig H. (1997).** Borna disease virus (BDV), a (zoonotic?) worldwide pathogen. A review of the history of the disease and the virus infection with comprehensive bibliography. *Zentbl. Veterinarmed. B* **44**: 147-184.
- Elford W.J. und Galloway I.A. (1933).** Filtration of the virus of Borna disease through graded colloidal membranes. *Br J Exp Pathol*: 196-205.

- Furrer E., Bilzer T., Stitz L. und Planz O. (2001).** Neutralizing antibodies in persistent borna disease virus infection: prophylactic effect of gp94-specific monoclonal antibodies in preventing encephalitis. *J Virol* **75**: 943-51.
- Göpfert P.A. Shaw K.L., Ritter G.D. Jr. und Mulligan M.J. (1997).** A sorting motif localizes the foamy virus glycoprotein to the endoplasmic reticulum. *J Virol* **71**: 778-84.
- Gonzalez-Dunia D., Cubitt B., Grasser F.A. und de la Torre J.C. (1997).** Characterization of Borna disease virus p56 protein, a surface glycoprotein involved in virus entry. *J Virol* **71**: 3208-18.
- Gonzalez-Dunia D., Cubitt B. und de la Torre J.C. (1998).** Mechanism of Borna disease virus entry into cells. *J Virol* **72**: 783-8.
- Gosztonyi G. und Ludwig H. (1984).** Borna disease of horses. An immunohistological and virological study of naturally infected animals. *Acta Neuropathol* **64**: 213-21.
- Hallenberger S., Moulard M., Sordel M., Klenk H.D. und Garten W. (1997).** The role of eukaryotic subtilisin-like endoproteases for the activation of human immunodeficiency virus glycoproteins in natural host cells. *J Virol* **71**: 1036-45.
- Hammond C. und Helenius A. (1994).** Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J Cell Biol* **126**: 41-52.
- Haselbeck A., Ross A. und Hösel W.(1992).** Deglycosylation of Glykoproteins on Blots. *Topics in Biochemistry* **10**: 1-5.
- Heaton L.A., Zuidema D. und Jackson A.O. (1987).** Structure of the M2 protein gene of sonchus yellow net virus. *Virology* **161**: 234-41.
- Heinig A. (1969).** Die Bornasche Krankheit der Pferde und Schafe. In H. Röhrer, ed. *Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren*. Fischer, Jena. 83-148.
- Herzog S. und Rott R. (1980).** Replication of Borna disease virus in cell cultures. *Med Microbiol Immunol* **168**: 153-8.
- Hobman T.C., Lemon H.F. und Jewell K. (1997).** Characterization of an endoplasmic reticulum retention signal in the rubella virus E1 glycoprotein. *J Virol* **71**: 7670-80.
- Hoffmann M.K., Pollack S., Krown S.E. und Mittler R.S. (1982).** Deletion of active human suppressor T lymphocytes from peripheral blood by Sephadex G-10 filtration. *J Immunol Methods* **55**: 327-36.
- Jackson M.R., Nilsson T. und Peterson P.A. (1990).** Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* **9**: 3153-62.

- Jones T.R., Hanson L.K., Sun L., Slater J.S., Stenberg R.M. und Campbell A.E. (1995).** Multiple independent loci within the human cytomegalovirus unique short region down-regulate expression of major histocompatibility complex class I heavy chains. *J Virol* **69**: 4830-41.
- Kaluza G., Repges S. und McDowell W. (1990).** The significance of carbohydrate trimming for the antigenicity of the Semliki Forest virus glycoprotein E2. *Virology* **176**: 369-78.
- Kiermayer S. (1999).** Die Reifung des Glykoproteins des Virus der Bornaschen Krankheit. Diplomarbeit, Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg.
- Kiermayer S., Kraus I., Richt J.A., Garten W. und Eickmann M. (2002).** Identification of the amino terminal subunit of the glycoprotein of Borna disease virus. *FEBS Lett* **531**: 255-8.
- Klenk H.D. und Garten W. (1994).** Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol* **2**: 39-43.
- Kohno T., Goto T., Takasaki T., Morita C., Nakaya T., Ikuta K., Kurane I., Sano K. und Nakai M. (1999).** Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus. *J Virol* **73**: 760-6.
- Kraus I., Eickmann M., Kiermayer S., Scheffczik H., Fluess M., Richt J.A. und Garten W. (2001).** Open reading frame III of borna disease virus encodes a nonglycosylated matrix protein. *J Virol* **75**: 12098-104.
- Lenz O. (1998).** Spaltprodukte des Glykoproteins gp94 des Virus der Bornaschen Krankheit. Diplomarbeit: Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg.
- Lenz O., ter Meulen J., Klenk H.D., Seidah N.G. und Garten W. (2001).** The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12701-5.
- Li Y., Luo L., Thomas D.Y. und Kang C.Y. (2000).** The HIV-1 Env protein signal sequence retards its cleavage and down-regulates the glycoprotein folding. *Virology* **272**: 417-28.
- Littman D.R., Thomas Y., Maddon P.J., Chess L. und Axel R. (1985).** The isolation and sequence of the gene encoding T8: a molecule defining functional classes of T lymphocytes. *Cell* **40**: 237-246.
- Lotan R., Beattie G., Hubbell W. und Nicolson G.L. (1977).** Activities of lectins and their immobilized derivatives in detergent solutions. Implications on the use of lectin affinity chromatography for the purification of membrane glycoproteins. *Biochemistry* **16**: 1787-94.
- Ludwig T.H., Becht H. und Groh L. (1973).** Borna disease (BD), a slow virus infection. Biological properties of the virus. *Med Microbiol Immunol* **158**: 275-89.

- Ludwig H., Kraft W., Kao M., Gosztanyi G., Dahme E. und Krey H. (1985).** Borna virus infection (Borna disease) in naturally and experimentally infected animals: its significance for research and practice. *Tierärztl Prax* **13**: 421-53.
- Martoglio B. und Dobberstein B. (1998).** Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* **8**: 410-5.
- Mayr A. und Danner K. (1972).** Production of Borna virus in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* **140**: 511-15.
- Munro S. und Pelham H.R. (1987).** A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**: 899-907.
- Munk K., Pritzer E., Kretzschmar E., Gutte B., Garten W. und Klenk H.D. (1992).** Carbohydrate masking of an antigenic epitope of influenza virus haemagglutinin independent of oligosaccharide size. *Glycobiology* **2**: 233-40.
- Nakamura N., Rabouille C., Watson R., Nilsson T., Hui N., Slusarewicz P., Kreis T.E. und Warren G. (1995).** Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J Cell Biol* **131**: 1715-26.
- Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S. und von Heijne G. (1997).** Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10**: 1-6.
- Nilsson T., Jackson M. und Peterson P.A. (1989).** Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* **58**: 707-18.
- Nowotny N., Kolodziejek J., Jehle C.O., Suchy A., Staeheli P. und Schwemmle M. (2000).** Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus. *J Virol* **74**: 5655-8.
- Ohuchi M., Orlich M., Ohuchi R., Simpson B.E., Garten W., Klenk H.D. und Rott R. (1989).** Mutations at the cleavage site of the hemagglutinin alter the pathogenicity of influenza virus A/chick/Penn/83 (H5N2). *Virology* **168**: 274-80.
- Pääbo S., Bhat B.M., Wold W.S. Peterson P.A. (1987).** A short sequence in the COOH-terminus makes an adenovirus membrane glycoprotein a resident of the endoplasmic reticulum. *Cell* **50**: 311-7.
- Pascale M.C., Erra M.C., Malagolini N., Serafini-Cessi F., Leone A. und Bonatti S. (1992).** Post-translational processing of an O-glycosylated protein, the human CD8 glycoprotein, during the intracellular transport to the plasma membrane. *J Biol Chem* **267**: 25196-201.
- Perez M., Watanabe M., Whitt M.A. und de la Torre J.C. (2001).** N-terminal domain of Borna disease virus G (p56) protein is sufficient for virus receptor recognition and cell entry. *J Virol* **75**: 7078-85.

- Richt J.A., van de Woude S., Zink M.C., Clements J.E., Herzog S., Frese K., Stitz L. und Narayan O. (1991).** Molecular and immunopathological studies of borna disease virus infection in rats. *Behring Inst Mitt* **89**: 163-76.
- Richt J.A., Schmeel A., Frese K., Carbone K.M., Narayan O. und Rott R. (1994).** Borna disease virus-specific T cells protect against or cause immunopathological Borna disease. *J Exp Med* **179**: 1467-73.
- Richt J.A., Pfeuffer I., Christ M., Frese K., Bechter K. und Herzog S. (1997).** Borna disease virus infection in animals and humans. *Emerg Infect Dis* **3**: 343-52.
- Richt J.A., Fürbringer T., Koch A., Pfeuffer I., Herden C., Bause-Niedrig I. und Garten W. (1998).** Processing of the Borna disease virus glycoprotein gp94 by the subtilisin-like endoprotease furin. *J Virol* **72**: 4528-33
- Sambrook J., Frische E. und Maniatis T. (1989).** Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanders R.W., Vesanen M., Schuelke N., Master A., Schiffner L., Kalyanaraman R., Paluch M., Berkhout B., Maddon P.J., Olson W.C., Lu M. und Moore J.P. (2002).** Stabilization of the soluble, cleaved, trimeric form of the envelope glycoprotein complex of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **76**: 8875-89.
- Schneemann A., Schneider P.A., Kim S., Lipkin W.I. (1994).** Identification of signal sequences that control transcription of borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J Virol* **68**: 6514-22.
- Schneider P.A., Hatalski C.G., Lewis A.J. und Lipkin W.I. (1997a).** Biochemical and functional analysis of the Borna disease virus G protein. *J Virol* **71**: 331-6.
- Schneider P.A., Kim R. und Lipkin W.I. (1997b).** Evidence for translation of the Borna disease virus G protein by leaky ribosomal scanning and ribosomal reinitiation. *J Virol* **71**: 5614-9.
- Schwemmle M. (1999).** Progress and controversy in Bornavirus research: a meeting report. *Arch Virol* **144**: 835-40.
- Seidah N. G., Chretien M. und Day R. (1994).** The family of subtilisin/kexin like proprotein and pro-hormone convertases: divergent or shared functions. *Biochimie* **76**: 197-209.
- Seidel W., Künkel F., Geisler B., Garten W., Herrmann B., Dühner L. und Klenk H.D. (1991).** Intraepidemic variants of influenza virus H3 hemagglutinin differing in the number of carbohydrate side chains. *Arch Virol* **120**: 289-96.
- Saito T. und Yamaguchi I. (2000).** Effect of glycosylation and glucose trimming inhibitors on the influenza A virus glycoproteins. *J Vet Med Sci* **62**: 575-81.

- Shibuya N., Goldstein I.J., Van Damme E.J. und Peumans W.J. (1988).** Binding properties of a mannose-specific lectin from the snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulb. *J Biol Chem* **263**: 728-34.
- Stitz L., Bilzer T., Richt J.A. und Rott R. (1993).** Pathogenesis of Borna disease. *Arch Virol Suppl* **7**: 135-51.
- Stoyloff R., Bode L., Borchers K. und Ludwig H. (1998).** Neutralization of borna disease virus depends upon terminal carbohydrate residues (alpha-D-man, beta-D-GlcNAc) of glycoproteins gp17 and gp94. *Intervirology* **41**: 135-40.
- Vahlenkamp T.W., Konrath A., Weber M. und Müller H. (2002).** Persistence of Borna disease virus in naturally infected sheep. *J Virol* **76**: 9735-43.
- Vey M., Schäfer W., Berghöfer S., Klenk H.D. und Garten W. (1994).** Maturation of the trans-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation. *J Cell Biol* **127**: 1829-42.
- Volchkov V.E., Volchkova V.A., Ströher U., Becker S., Dolnik O., Cieplik M., Garten W., Klenk H.D. und Feldmann H. (2000).** Proteolytic processing of Marburg virus glycoprotein. *Virology* **268**: 1-6.
- Vyas KA, Patel HV, Vyas AA, Schnaar RL. (2001).** Segregation of gangliosides GM1 and GD3 on cell membranes, isolated membrane rafts, and defined supported lipid monolayers. *Biol Chem* **382**: 241-50.
- Walker B.D., Kowalski M., Goh W.C., Kozarsky K., Krieger M., Rosen C., Rohrschneider L., Haseltine W.A. und Sodroski J. (1987).** Inhibition of human immunodeficiency virus syncytium formation and virus replication by castanospermine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 8120-4.
- Yang M., Ellenberg J., Bonifacino J.S. und Weissman A.M. (1997).** The transmembrane domain of a carboxyl-terminal anchored protein determines localization to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **272**: 1970-5.

10 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1:	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines freien, pleomorphen Partikels des Virus der Bornaschen Krankheit.	4
Abbildung 2:	Schematischer Aufbau des BDV Einzelstrang RNA Genoms in negativer Orientierung.	5
Abbildung 3:	Schematischer Überblick zum BDV Glykoprotein und seinen Spaltprodukten.	6
Abbildung 4:	Schematische Übersicht der Bindungsorte der verwendeten Oligonukleotide.	15
Abbildung 5A:	Übersicht zu den antigenen Bereichen der Anti-Peptidseren Rb- α GP-C und Rb- α GP-N im Glykoprotein GP des Virus der Bornaschen Krankheit.	35
Abbildung 5B:	Erkennung des BDV-Glykoproteins durch die Anti-Peptidseren Rb- α GP-C und Rb- α GP-N im Westernblot.	36
Abbildung 6:	Identifizierung des N-terminalen Spaltprodukts GP-N.	38
Abbildung 7A:	Charakterisierung der N-Glykane des C-terminalen Spaltprodukts GP-C des BDV-Glykoproteins.	39
Abbildung 7B:	Charakterisierung der N-Glykane des N-terminalen Spaltprodukts GP-N des BDV-Glykoproteins.	40
Abbildung 8:	Infektionskontrolle der BDV angereicherten Präparation aus Überständen BDV-infizierter MDCK-Zellen.	41
Abbildung 9:	Nachweis der BDV-Glykoproteinanteile in einer BDV-angereicherten Präparation.	42
Abbildung 10:	Das unglykosylierte N-terminale Spaltprodukt GP-N in einer BDV-angereicherten Präparation.	43
Abbildung 11:	Zellfraktionierung von permanent BDV-infizierten Zellen und intrazelluläre Lokalisation des BDV-Glykoproteins.	46

Abbildung 12:	Überblick zum Membranprotein des Typ I.	47
Abbildung 13:	Subzellulären Verteilung der Proteine CD8 α und CD8-BDV-SP.	49
Abbildung 14:	Schematische Darstellung der Proteine CD8 α , CD8-E3/K19, CD8-BDV-TM/CT, und CD8-BDV-CT.	50
Abbildung 15A:	Subzellulären Verteilung der Proteine CD8 α , CD8-E3/K19, CD8-BDV-TM/CT und CD8-BDV-CT in der indirekten Immunfluoreszenz.	52
Abbildung 15B:	Expression der CD8-Konstrukte an der Zelloberfläche.	53
Abbildung 16:	Autoradiographie und Zelloberflächenlokalisation der CD8-Chimären CD8-BDV-TM/CT und CD8-BDV-CT.	54
Abbildung 17 :	Schematischer Überblick zur Virusaufnahme und Virusmorphogenese in einer eukaryontischen Zelle.	65
Tabelle 1:	Übersicht der verwendeten Lektine, ihrer Bindungsspezifität und fällbare Anteile des BDV-Glykoproteins.	37

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. Wolfgang Garten, Institut für Virologie, danke ich für die Bereitstellung dieses interessanten, sehr vielseitigen Themas, sowie für die fachliche und freundliche Unterstützung über die letzten Jahre.

Herrn Professor Dr. Wolfgang Buckel, Abteilung Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie, möchte ich danken für die Betreuung und Vertretung dieser Arbeit am Fachbereich Biologie.

Bei Dr. Markus Eickmann möchte ich mich ganz herzlich für die fachliche und persönliche Unterstützung und die immer ideenreiche und kompetente Diskussionsbereitschaft bedanken.

Bei Ina Kraus, Adriana Przybylla, Amir Reza Vahhabzadeh, Carsten Schöneberg und allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich mich für das nette und kooperative Arbeitsklima danken.

Ein großes Danke schön an Martina Weik, die geduldig und „unermüdlich“ diese Arbeit vor dem orthographischen Desaster bewahrt hat.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie für die sehr angenehme Atmosphäre und die Hilfsbereitschaft im Haus.

Meiner Familie danke ich für die liebevolle und verlässliche Unterstützung während dieser Zeit.

ERKLÄRUNG

ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Charakterisierung des Glykoproteins des Virus der Bornaschen Krankheit“

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort,Datum)

(Unterschrift)

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Simone Kiermayer
Geburtsdatum: 2. Mai 1975
Geburtsort: Straubing

Hochschulausbildung

seit Jan. 2000	Doktorarbeit am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Garten, Thema: „Charakterisierung des Glykoproteins des Virus der Bornaschen Krankheit“.
Nov. 1998-1999	Diplomarbeit am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg, Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Garten, Thema: „Die Reifung des Glykoproteins gp94 des Virus der Bornaschen Krankheit“.
Okt. 1998	Diplom-Prüfung in den Fächern: Mikrobiologie (Hauptfach), Genetik, Biochemie, Virologie (Nebenfächer).
April-Juli 1998	Praktikum in der Pharmazie, Labor de Microbiologie Industrielle, an der Université de Paris-Sud.
1996-1998	Hauptstudium des Studienganges Biologie an der Philipps-Universität Marburg.
Okt. 1996	Diplom-Vorprüfung in den Fächern: Zoologie, Botanik, Chemie, Physik.
1994 bis 1996	Grundstudium des Studienganges Biologie an der Philipps-Universität Marburg.

Schul Ausbildung

Juli 1994	allgemeine Hochschulreife am Ernährungswissenschaftlichen Gymnasium Heilbronn-Böckingen.
Juli 1991	Mittlere Reife, Realschule Gundelsheim.